

Université de Montréal

**Rôles non-canoniques des arrestines dans la signalisation et
l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G**

par Justine Paradis

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en Biologie Moléculaire
option Biologie des Systèmes

Avril 2017

© Justine Paradis, 2017

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires et sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques. Cette famille de récepteurs constitue aussi une cible majeure dans la recherche pharmaceutique au vu de son importance dans de nombreuses pathologies. La signalisation des RCPG est étroitement régulée. Plusieurs kinases activées en aval du récepteur initient des boucles de régulation négative. Les arrestines jouent un rôle clé dans ces processus de régulation en favorisant la désensibilisation du récepteur activé par le ligand, suivie de son endocytose. Ainsi, les arrestines contrôlent la durée et l'amplitude de la transmission du signal à la surface de la cellule. Ces dernières années, plusieurs rôles non-canoniques ont été attribués aux arrestines comme l'activation de voies de signalisation post-endocytiques, ou la modulation de la régulation croisée entre les RCPG et d'autres acteurs de la signalisation cellulaire.

Le premier objectif de mon travail de recherche est d'examiner l'effet réciproque de l'activation des kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) sur la signalisation des RCPG. Nous avons démontré que la stimulation de ERK1/2, soit par un récepteur de surface soit par l'utilisation d'un mutant constitutivement actif, conduit à la baisse de l'expression de surface basale de nombreux RCPG. Des essais kinases *in vitro*, combinés à des expériences de complémentation dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), où les gènes β -arrestine-1/2 ont été supprimés, démontrent l'importance de la phosphorylation par ERK1/2 des résidus Ser14 et Thr276 dans ce mécanisme de séquestration des RCPG. Cette régulation, contrôlée par ERK1/2 et arrestine, conduit à une baisse globale de la capacité de réponse de la cellule aux stimuli extracellulaires.

Le deuxième objectif de mon travail de recherche est d'identifier et de développer une petite molécule organique qui inhibe l'interaction entre l'arrestine et la protéine adaptatrice du complexe d'endocytose AP-2, sans toutefois empêcher la formation du complexe arrestine/récepteur. Cet inhibiteur, nommé Barbadin, bloque sélectivement les processus d'internalisation dépendants de l'interaction entre arrestine- et la sous-unité β 2 de la protéine

adaptatrice AP-2. Barbadin représente le premier inhibiteur des fonctions d'arrestine, et nous avons démontré son utilité comme outil analytique pour déterminer la contribution des arrestines dans l'activation de plusieurs voies de signalisation en aval des RCPG, telles que la production d'AMP cyclique (AMPC) ou l'activation des kinases ERK1/2. Nos résultats démontrent l'importance du complexe arrestine/AP-2 dans la signalisation dépendante et indépendante des protéines G.

Le troisième objectif de mon travail de recherche est de développer un biosenseur BRET capable de mesurer les changements de conformation du suppresseur de tumeur PTEN. Nous avons validé ce biosenseur en mesurant l'activation de PTEN suite à des mutations ciblées déstabilisant les interactions intramoléculaires au sein de cette protéine ou en modulant différentes voies de signalisation qui affectent sa fonction. Nous avons démontré l'intérêt de ce nouvel outil dans l'étude des interactions entre PTEN et des partenaires protéiques, en utilisant deux interacteurs connus pour activer PTEN : β -arrestine-2 et RhoA. Finalement, en utilisant ce biosenseur, nous avons démontré pour la première fois la capacité de plusieurs RCPG à induire l'activation de PTEN. Étant donné le rôle central de PTEN dans le développement tumoral, ce biosenseur constitue aussi un outil précieux pour la recherche de nouveaux médicaments anti-cancer.

Ainsi, au travers de ces trois lignes directrices, nous avons pu mettre en lumière de nouveaux rôles non-canoniques des arrestines, soit dans l'activation de voies de signalisation, (comme la production d'AMPC, l'activation de ERK1/2 ou de PTEN), soit comme régulateur négatif de la signalisation des RCPG après phosphorylation par ERK1/2. Ce travail a été rendu possible par le développement de nouveaux outils pour l'étude des RCPG : un inhibiteur de β -arrestine, Barbadin, et un biosenseur BRET de PTEN ; tous deux ayant démontré leur utilité dans l'étude des voies de signalisation non-canoniques des arrestines.

Mots-clés : arrestine, récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), voie ERK/MAPK, internalisation, protéine adaptatrice AP-2, inhibiteur pharmacologique, phosphatase et tensine homologue (PTEN), biosenseur, transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET)

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) form the biggest family of membrane receptors and are involved in numerous physiological processes. Collectively, these receptors are also prominently targeted by the pharmaceutical industry due to their implications in multiple diseases and disorders. GPCR signaling is tightly regulated. Several kinases, activated downstream of the receptor, initiate negative feedback loops; and arrestins play a crucial role in these regulatory processes by desensitizing the ligand-activated receptor and promoting its endocytosis. By doing so, arrestins control the duration and the amplitude of signal transduction at the cell surface. In the last few years, several non-canonical roles have also been attributed to arrestins, such as the post-endocytic activation of several signalling pathways, or the regulation of crosstalks between GPCRs and various other signalling events. My thesis project was aimed at providing a better understanding of the non-canonical functions of arrestins.

The first objective of my research work was to investigate a possible reciprocal effect of the activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) on GPCR signaling. We demonstrated that stimulation of ERK1/2, either by a cell surface receptor or a constitutively active mutant, leads to a reduction in steady-state expression levels of many GPCRs at the cell surface. This receptor redistribution mechanism is dependent on β -arrestins phosphorylation. *In vitro* kinase assays combined with complementation experiments in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking β -arrestins, revealed that β -arrestin-2 phosphorylation on Ser14 and Thr276 is essential for the ERK1/2-promoted GPCR sequestration. This ERK1/2- and arrestins-mediated regulatory process was found to result in a global dampening of cell responsiveness.

The second objective of my research work was to identify and develop a small organic compound that inhibits the interaction between arrestins and the adaptor protein AP-2, without interfering with the recruitment of arrestin to the receptor. This inhibitor, named Barbadin, was found to specifically block endocytic processes that are dependent on the interaction between arrestins and the appendage domain of the β -subunit of AP-2. We demonstrated its value as an analytical tool in studying the role of the arrestins in GPCR signaling, such as cAMP production

and ERK1/2 activation. These results support the concept that β -arrestin/AP-2-dependent signaling is important to both G protein-dependent and -independent pathways.

The third objective of my research work was to develop a BRET-based biosensor able to detect signal-dependent PTEN conformational changes. This biosensor was validated by monitoring PTEN activation induced by targeted mutations affecting key intramolecular interactions or by modulating signalling pathways that impact PTEN function. We also demonstrated the value of this biosensor in studying PTEN/protein interactions using two known interactors that activate PTEN, β -arrestin-2 and RhoA. Finally, we uncovered PTEN activation by several GPCRs, previously unknown as PTEN regulators. Given the central role of the tumor suppressor PTEN in oncogenesis, this biosensor could also provide a precious tool for anti-cancer drug research.

To conclude, my research work highlighted non-canonical mechanisms for arrestins to activate GPCR-dependent signaling pathways, such as cAMP, ERK1/2 and PTEN, as well as negatively regulate GPCR signaling upon phosphorylation by ERK1/2. This work was made possible by the development of new tools: a β -arrestin inhibitor named Barbadin and a PTEN BRET-based biosensor that have both shown their usefulness in studying β -arrestin non-canonical signaling.

Keywords: arrestin, G protein-coupled receptor (GPCR), ERK/MAPK pathway, internalization, adaptor protein AP-2, pharmacological inhibitor, phosphatase and tensin homolog (PTEN), biosensor, bioluminescence resonance energy transfer (BRET).

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xix
Avant-propos.....	1
Introduction.....	3
1. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	3
1.1. Généralités.....	3
1.2. Structure des RCPG.....	5
1.2.1. La Rhodopsine : modèle d'étude prototypique de la structure des RCPG.....	5
1.2.2. Caractéristiques structurales des RCPG.....	6
1.3. Classification des RCPG.....	9
1.3.1. Le modèle de Kolakowski.....	9
1.3.2. Le modèle GRAFS.....	10
1.4. Signalisation canonique des RCPG : les protéines G.....	12
1.4.1. Généralités.....	12
1.4.2. Signalisation des sous-unités $G\alpha$	12
1.4.3. Signalisation des sous-unités $G\beta\gamma$	15
1.4.4. Mécanismes moléculaires d'activation des protéines G.....	16
2. Arrestines : régulateurs de la signalisation et du trafic des RCPG.....	18
2.1. Généralités.....	18
2.2. Les arrestines dans différents organismes modèles.....	19
2.3. Activation et changements conformationnels.....	20

2.3.1.	Le senseur phosphate	20
2.3.2.	Le senseur d'activation	24
2.4.	Désensibilisation des RCPG	28
2.4.1.	Désensibilisation dépendante de la phosphorylation	28
2.4.2.	Désensibilisation indépendante de la phosphorylation	33
2.5.	Endocytose des RCPG	34
2.5.1.	Endocytose induite par le ligand et endocytose constitutive	34
2.5.2.	Endocytose β -arrestine- et clathrine-dépendante	35
2.5.3.	Endocytose β -arrestine-indépendante et clathrine-dépendante	42
2.5.4.	Endocytose β -arrestine-indépendante et clathrine-indépendante	44
2.6.	Trafic intracellulaire des RCPG	44
2.6.1.	Phosphorylation des RCPG et interaction avec arrestine	45
2.6.2.	Endosome précoce : centre de triage des protéines cargo	46
2.6.3.	Adressage des RCPG vers les voies de dégradation	47
2.6.4.	Adressage des RCPG vers les voies de recyclage	52
2.7.	Modifications post-transcriptionnelles et modulation du trafic des RCPG	54
2.7.1.	Modifications post-transcriptionnelles des RCPG	54
2.7.2.	Modifications post-transcriptionnelles des arrestines	57
3.	Les arrestines : acteurs de la signalisation des RCPG	60
3.1.	β -arrestine : protéine d'échafaudage pour l'activation des voies de signalisation en aval des RCPG	60
3.1.1.	Activation des kinases de la famille Src	60
3.1.2.	Voie ERK/MAPK	62
3.1.3.	Voie JNK/MAPK	67
3.1.4.	Voie PI3K/Akt	68
3.1.5.	Voie NF κ B	71
3.1.6.	Translocation nucléaire d'arrestine et régulation de la transcription	72
3.2.	Signalisation endosomale des RCPG	73
3.2.1.	Signalisation des protéines G depuis les endosomes	73
3.2.2.	Super-complexe RCPG/protéine G/arrestine	77

3.2.3. Les rétromères : régulateurs de la signalisation endosomale des protéines G..	80
3.3. Régulation de l'activité signalétique des arrestines	81
3.3.1. Hypothèse du code-barres de phosphorylation des RCPG	81
3.3.2. Régulation d'arrestine par modifications post-transcriptionnelles	82
Objectifs de la thèse	85
Résultats	88
Article 1	88
<i>Receptor sequestration in response to β-arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression</i>	88
Article 2	131
<i>A New Inhibitor of the β-arrestin/AP2 Endocytic Complex Reveals Interplay Between GPCR Internalization and Signaling</i>	131
Article 3	211
<i>A biosensor to monitor dynamic regulation and function of tumour suppressor PTEN in living cells.</i>	211
Discussion	260
1. Discussion générale	260
2. Régulation du trafic des RCPG par ERK1/2.....	261
2.1. Modèle	261
2.2. Caractérisation du mécanisme cellulaire	262
2.3. Phosphorylation d'arrestine par ERK1/2	264
2.4. Modulation des RTK par arrestine.....	269
2.5. Un récepteur, plusieurs voies d'internalisation.....	270
2.6. Modification du surfaceome par la voie Ras/MAPK.....	272
3. Développement de nouveaux outils pharmacologiques pour l'étude de la signalisation intracellulaire des RCPG.....	273
3.1. Criblage virtuel basé sur la structure	274
3.2. Inhibiteur de l'interaction β -arrestine/RCPG.....	277
3.3. Confirmation du hit « Barbadin ».....	279

3.4.	Barbadin et signalisation des RCPG	282
3.5.	Relation structure à activité	282
4.	Développement de nouveaux biosenseurs pour l'étude de la signalisation des RCPG ..	284
4.1.	Validation du biosenseur PTEN.....	284
4.2.	Utilisation du biosenseur PTEN pour un criblage d'inhibiteurs pharmacologiques	287
	Conclusion	288
	Bibliographie.....	289

Liste des tableaux

Tableau I.	RCPG présentant une signalisation soutenue via les protéines G.....	74
Tableau II.	Biosenseurs disponibles pour l'EbBRET.....	266
Tableau III.	Liste des structures cristallographiques des arrestines.....	275

Liste des figures

Figure 1.	Représentation schématique d'un RCPG.....	8
Figure 2.	Classification des RCPG selon le modèle de GRAFS.....	11
Figure 3.	Activation des RCPG et signalisation par les protéines G.....	14
Figure 4.	Structure active et inactive du complexe β 2AR/Gs.....	17
Figure 5.	Structure aux rayons-X d'arrestine-2 inactive (PDB 1G4R).....	21
Figure 6.	Les senseurs phosphate.....	23
Figure 7.	Réarrangement des boucles centrales lors de l'activation d'arrestine.....	26
Figure 8.	Engagement de β -arrestine-1 au récepteur β 2V2R.....	27
Figure 9.	Cycle d'activation et désensibilisation d'un RCPG.....	29
Figure 10.	Représentation schématique d'AP-2.....	37
Figure 11.	Structure du complexe β 2-adaptine/ β -arrestine-1.....	39
Figure 12.	Structure schématique de la clathrine et d'un puit recouvert de clathrine.....	41
Figure 13.	Structure du complexe clathrine/ β -arrestine-1.....	41
Figure 14.	Différents types d'ubiquitination des RCPG.....	48
Figure 15.	Dégradation lysosomale des RCPG.....	50
Figure 16.	Recyclage des RCPG.....	53
Figure 17.	Cascades MAPK.....	63
Figure 18.	Supercomplexe récepteur/arrestine/protéine G.....	78
Figure 19.	Modèle de régulation par ERK1/2 du trafic des RCPG.....	263
Figure 20.	Bystander BRET et identification de compartiments subcellulaires.....	265
Figure 21.	Affinité de β -arrestine-2 pour le récepteur β 2Ar <i>in vitro</i>	268
Figure 22.	Internalisation de CXCR4 en absence d'arrestine.....	271
Figure 23.	Inhibition de l'internalisation de V2R par UM012685.....	278
Figure 24.	Séquences du C-ter β -arrestine-1 et β -arrestine-2.....	281
Figure 25.	Inhibition de l'activation de ERK1/2 par Barbadin.....	283
Figure 26.	Analogues de Barbadin.....	285

Liste des abréviations

3D	tridimensionnel
AAK1	Kinase associée à l'adaptateur
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIP4	Atrophin-1-interacting protein 4
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AO-biotine	Aminoxy-biotine
AP-2	Protéine adaptatrice de type 2
ARN	Acide ribonucléique
ASRT	Actin/sorting nexin/ 27-retromer tubule
ATP	Adénosine triphosphate
Boucle e _x	Boucle extracellulaire x
Boucle i _x	Boucle intracellulaire x
BRET	Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance
C-ter	C-terminal
Cellule HEK	Cellule de rein embryonnaire humain
Cellules MEF	Cellules fibroblastiques embryonnaires de souris
CFP	Protéine fluorescente cyan
CISK	Cytokine-independent survival kinase
CKII	Caséine kinase II
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
DAG	Diacylglycérol
DEER	Spectrométrie par résonance paramagnétique électronique
Domaine SH	Domaine homologue à Src
Domaine TM	Domaine transmembranaire
DUB	Déubiquitinase
EbBRET	Enhanced bystander BRET
eIF4E	Facteur eucaryote d'initiation de la transcription 4E
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

ESCRT	Endosome sorting complex required for transport
FAK	Kinase d'adhésion focale
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonnance
GAP	Protéine activatrice des GTPases
GASP	GPCR-associated sorting proteins
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de nucléotides de guanine
GFP	Protéine fluorescence verte
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRK	Kinase des RCPG
GTP	Guanosine triphosphate
HDX-MS	Échange hydrogène/deutérium associé à la spectrométrie de masse
HEK	Cellules humaines de rein embryonnaire (Human embryonic kidney cells)
Hrs	Hepatocyte-growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HTS	High throughput screening
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
IP ₆	Inositol hexaphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KO	Knock-out
LC-biotine	Sulfo-NHS-LC-biotin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEF	Fibroblastes embryonnaires de souris (mouse embryonic fibroblasts)
MEK	MAPK/ERK kinase
MKK	MAPK kinase
Mnk1	MAP kinase-interacting kinase 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
N-ter	N-terminal
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Nb	Nanobody
NES	Séquence d'export nucléaire
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NOS	NO synthase
p44	Forme mutante pré-activée d'arrestine-1
PDB	Protein Databank
PDE6	Phosphodiesterase 6
PKD1	Kinase phosphatidylinositol-3-dépendante 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PIP5K	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC β	Phospholipase C β
PMA	Myristate acétate de phorbol
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS	Protéines régulatrices de la signalisation des protéines G
RLuc	<i>Renilla</i> Luciferase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RSK	p90 Ribosomal S6 Kinase
RTK	Récepteur tyrosine kinase
S6K	Kinase S6
SAPK	Stress-activated protein kinase
SNX27	Sorting nexin family member 27
TEM	Microscopie électronique à transmission
TIRF	Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne

TM	Transmembranaire
TSC	Tuberous sclerosis complex
UBD	Motif de liaison à l'ubiquitine
UIM	Motif de reconnaissance de l'ubiquitine
USP	Ubiquitin-specific processing peptidase
WT	Sauvage (wildtype)
YFP	Protéine fluorescente jaune

Récepteurs

5-HT _{1A}	Récepteur à la sérotonine de type 1A
5-HT _{2A}	Récepteur à la sérotonine de type 2A
AT1R	Récepteur à l'angiotensine de type 1
BLT1	Récepteur au leukotriène
CB1	Récepteur cannabinoïde de type 1
CXCR2	Récepteur aux chimiokines CXC de type 2
CXCR4	Récepteur aux chimiokines CXC de type 2
D1R	Récepteur à la dopamine de type 1
EGFR	Récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor)
ERBB2	Récepteur tyrosine kinase Erb-b2
ET _A R	Récepteur à l'endothéline de type A
FP	Récepteur à la prostaglandine
FPR	Récepteur au peptide formyle
GABA _B	Récepteur GABAergique de type b
hOR17-4	Récepteur olfactif humain 17-4
IGF-1R	Récepteur à l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1)
IP	Récepteur à la prostacycline
IRIC	Institut de recherche en immunologie et cancer
LPAR1	Récepteur à l'acide lysophosphatidique de type 1
M1MR	Récepteur muscarinique de type M1
m2 mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine de type 2
M2R	Récepteur muscarinique de type 2

m3 mAChR	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine de type 3
M3R	Récepteur muscarinique de type 3
mGluR1	Récepteur métabotrope au glutamate de type 1
mGluR8	Récepteur métabotrope au glutamate de type 8
PAR1	Récepteur activé par la protéase de type 1
PAR2	Récepteur activé par la protéase de type 2
PTHrR	Récepteur à l'hormone parathyroïdienne
S1PR1	Récepteur à la sphingosine de type 1
S1PR2	Récepteur à la sphingosine de type 2
SR	Récepteur à la sécrétine
Ste2	Récepteur à la phéromone facteur α de type 2
Ste3	Récepteur à la phéromone facteur α de type 3
TfR	Récepteur à la transferrine
TP α R	Récepteur à la thromboxane
TSHR	Récepteur à l'hormone thyroïdienne
V1 _A R	Récepteur à la vasopressine de type 1 _A
V2R	Récepteur à la vasopressine de type 2
V2Rpp	Phosphopeptide dérivé de la queue C-ter du récepteur V2R
V2 β 2AR	Récepteur V2R dans lequel la queue C-ter a été tronquée et remplacée par celle du β 2AR
β 2V2R	Récepteur β 2AR dans lequel la queue C-ter a été tronquée et remplacée par celle du V2R
α _{1b} AR	Récepteur α -adrénergique de type 1B
α ₂ AR	Récepteur α -adrénergique de type 2
β 2AR	Récepteur β 2-adrénergique
δ OR	Récepteur aux opiacés de type δ
μ OR	Récepteur aux opiacés de type μ

Acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre
Alanine	Ala	A

Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartate	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

*« Il est peu de réussites faciles,
et d'échecs définitifs. »*

Marcel Proust

Le temps retrouvé (1927)

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier mes directeurs de thèse Dr. Michel Bouvier et Dr. Philippe Roux. Plus qu'une simple formation académique, le doctorat représente un grand voyage et la qualité du guide qui vous accompagne participe grandement à la réussite de votre expédition. Je me sens donc très privilégiée d'avoir pu poursuivre mes études doctorales à leurs côtés. Michel, ta passion pour la recherche et ta soif de partage font de toi un superviseur exceptionnel. Philippe, j'ai énormément appris de nos rencontres et de nos discussions pendant lesquelles tu m'as transmis les connaissances mais aussi les outils de la pensée qui m'ont permis de me construire scientifiquement, merci pour ton enthousiasme et ta disponibilité.

Merci aux membres des labos, présents et passés. J'ai eu la chance d'être entourée par une équipe de scientifiques passionnés. La science est un travail d'équipe et rien de tout ça n'aurait été possible sans vous. Merci pour toutes les discussions passionnantes autour de la science, et aussi pour toutes ces soirées à rire et à oublier un peu le labo.

Merci à Monique ! Tu te soucies sincèrement de chacun d'entre nous, ce qui fait de toi la première personne vers qui se tourner lorsque l'on fait face à un problème, du plus petit au plus gros. Merci de m'avoir ouvert tes bras lorsque j'en avais le plus besoin. Tu mérites ton surnom de « maman du labo » et ça va être difficile de couper le cordon !

Merci à Mireille ! Merci d'avoir accepté de m'aider pour mener à bien les derniers projets de mon doctorat. J'ai beaucoup apprécié travailler en équipe avec toi. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta disponibilité, en plus de toutes tes qualités scientifiques.

Je remercie aussi chaleureusement le Dr. Stefano Marullo ainsi que les Drs Hervé Enslin et Mark Scott qui m'ont accueilli dans leur laboratoire à l'Institut Cochin pendant près de un an et demi. Merci pour tout le temps que vous m'avez accordé, pour vos bons conseils et pour votre bonne humeur. Nos discussions ont été une source d'inspiration qui m'a permis d'avancer dans mes recherches. Merci aussi à tous les membres du laboratoire pour leur aide et leur accueil.

Un grand merci à mes parents, Dominique et Jacques. Depuis le début, vous m'avez soutenu dans tous mes choix et encouragé à suivre ma voie, même quand cela signifiait partir vivre à 5000 km ! Sans votre soutien, et sans tous les sacrifices que vous avez fait pour moi (de

bon cœur !) aux cours de ces dernières années, je n'en serai certainement pas là aujourd'hui. Votre amour et votre fierté ont toujours été un moteur essentiel à ma progression ; malheureusement papa n'est plus là pour partager ce moment avec nous, mais je sais à quel point il aurait été heureux aujourd'hui et c'est pourquoi je lui dédie ce manuscrit.

Un grand merci à Arthur, avec qui j'ai la chance de partager ma vie. Merci d'être toujours là dans les moments heureux, comme dans les moments difficiles. Sans ta présence à mes côtés, je n'aurais certainement pas réussi à tenir le cap ces dernières années. Merci de toujours savoir comment me motiver et me redonner confiance quand j'en ai besoin. Merci aussi pour toutes les fins de semaine passées au labo (pour les mini-preps et le reste !), tout ça pour que l'on puisse partager quelques heures de plus ensemble. Cette thèse, c'est aussi un peu la tienne... Merci aussi à notre petite fille, qui me rappelle tous les jours, à grand renfort de petits coups, que j'ai un délai à tenir pour l'écriture de cette thèse !

Merci aussi à ma belle-famille : Lilian, Jean-Pierre, Pascale, Didier, Josette et Jean, pour votre soutien, votre amour et tous les beaux moments partagés à chaque retour en France.

Je veux remercier aussi tous ceux qui ont participé à faire de Montréal notre « chez nous » : Julie et Benjamin, ces six années de doctorat valaient la peine rien que pour vous rencontrer ! Alex, Sarah, Gabrielle et Raphaëlle, notre petite famille montréalaise ; Brigitte pour nos séances endiablées avec Victorrr, toutes nos soirées « Damon » et pour les mojitos ; Élodie et son amour inconditionnel pour le Québec, mais aussi Charlotte, Viviane et Martin, Joris et Sarah, Simon et Magalie, Geneviève, Nick, Sara, Éric, Martin, Bianca, Antoine, Farah, Sami, Beichen, Neethi, Alan, Louis-Philippe et Shane.

Enfin merci aux amis qui ont su rester aussi proche tout en habitant si loin : Nanou, Fanny, Alison, Vukasin, Laurent, Marie-Gabrielle, Luc, Guillaume, Pierre, Graziella et la team Nordmann.

Pour finir, je remercie tous mes collaborateurs, sans qui les projets sur lesquels j'ai été impliquée n'auraient pas pu être aussi aboutis. Je remercie aussi l'IRICOR qui m'a soutenu financièrement lors de ma première année de thèse.

Avant-propos

La signalisation cellulaire est un mécanisme complexe par lequel la cellule peut percevoir son environnement et traduire ces informations en une réponse adaptée. Chez les organismes unicellulaires, chaque cellule forme une unité indépendante, toutefois capable d'influencer le comportement d'autres cellules. Certaines bactéries sécrètent dans leur milieu une molécule dite auto-inducteur, dont la concentration augmente en fonction de la densité de la population, et qui induit la régulation coordonnée de certains gènes. Par des mécanismes similaires, la plupart des organismes unicellulaires ont développé des systèmes de communication leur permettant de réagir localement comme une colonie cohérente plutôt que comme une simple somme d'unités indépendantes.

La notion de signalisation cellulaire est d'autant plus importante lorsque l'on se réfère à un organisme pluricellulaire. Le corps humain compte près de cent milliards de cellules devant fonctionner de concert afin de permettre le maintien de l'homéostasie. Pour des cellules adjacentes, le signal peut être transmis directement par contact direct via des jonctions communicantes, cela porte le nom de communication juxtacrine. Dans le cas d'un transfert d'information à plus grande échelle ou à plus grande distance, la cellule excrète un messager chimique, tel qu'un neurotransmetteur ou une hormone, qui aura une action soit autocrine (sur la cellule elle-même), soit paracrine (sur des cellules distinctes mais à courte distance), ou encore endocrine (à grande distance, en utilisant par exemple la circulation sanguine pour transporter ces messagers chimiques vers un autre tissu). Selon leurs propriétés biochimiques, ces ligands peuvent alors traverser la membrane de la cellule pour atteindre une cible intracellulaire, souvent un récepteur nucléaire, ou bien se lier à un récepteur transmembranaire. Les récepteurs ont pour rôle de traduire le signal reçu en une réponse cellulaire adaptée.

La signalisation cellulaire implique une grande variété de signaux, mais aussi de récepteurs capables d'y répondre de manière spécifique. Ainsi, les récepteurs membranaires se divisent en trois grandes catégories : les récepteurs couplés aux canaux ioniques qui permettent le passage des ions à travers la membrane plasmique, les récepteurs couplés à une enzyme et les récepteurs couplés aux protéines G. Parmi les récepteurs couplés à une enzyme, certains

possèdent un domaine kinase intrinsèque qui appartient soit à la classe des sérine/thréonine kinases, soit à la classe des tyrosine kinases (récepteurs RTK), et d'autres s'associent à des protéines kinases cytoplasmiques (récepteurs de cytokines).

Mes travaux de doctorat portent sur les récepteurs couplés aux protéines G. Leurs caractéristiques structurelles, leurs activités signalétiques ainsi que leurs modes de régulation seront décrits dans le chapitre d'introduction.

Introduction

1. Les récepteurs couplés aux protéines G

1.1. Généralités

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont aussi connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires. Cette architecture moléculaire est apparue très tôt dans l'évolution puisque des similarités de structures ont été mises en évidence entre des photopigments présents chez des bactéries et archaebactéries d'un côté, et les RCPG eucaryotes de l'autre, ce qui en fait un exemple frappant d'évolution convergente (1).

Les RCPG sont des protéines membranaires intégrales polytopiques qui présentent une architecture moléculaire conservée avec un domaine amino-terminal extracellulaire (N-ter), sept domaines transmembranaires (TMI à TMVII) reliés entre eux par trois boucles intracellulaires (i1 à i3) et extracellulaires (e1 à e3), et une extrémité carboxy-terminale (C-ter) du côté cytoplasmique de la membrane. De manière simplifiée, la liaison du ligand sur la face extracellulaire du récepteur, provoque un changement conformationnel qui entraîne l'activation des protéines G hétérotrimériques et la production de messagers secondaires.

Chez l'Homme, les RCPG forment la plus grande famille de protéines membranaires avec plus de 800 membres, ce qui représente 4% du génome humain. Ils répondent à une grande variété de stimuli allant des plus petits comme les photons, les ions ou encore les molécules odorantes, jusqu'à des molécules de taille beaucoup plus conséquentes comme des lipides ou de petites protéines. De par leur caractère ubiquitaire, ces récepteurs sont impliqués dans une grande variété de processus physiologiques et modulent, par exemple, la vue, le goût et l'odorat, la chimiotaxie, la contraction, la neurotransmission et la fonction cardiaque. En conséquence, un grand nombre de pathologies a été relié à un dysfonctionnement des RCPG incluant : des troubles métaboliques, reproductifs et immunologiques, des maladies cardiovasculaires et

neurodégénératives, ainsi que des cancers (2). Ainsi, les RCPG sont au cœur de la médecine moderne et ils sont actuellement la cible de plus de 40% des médicaments sur le marché, soit car ils sont à l'origine du développement d'une maladie, ou parce que les cibler permet de traiter un symptôme donné.

Historiquement, les progrès dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire ont conduit à la purification (3-7) suivie rapidement du clonage des premiers RCPG dans les années 1980 (8-12). Cela a permis l'expression exogène de ces récepteurs dans des modèles cellulaires (13) ainsi qu'une progression exponentielle de notre compréhension des mécanismes régissant leur signalisation et régulation (14). L'analyse de la séquence du récepteur β 2-adrénergique (β 2AR) met en évidence de nombreuses similarités avec la protéine rhodopsine bovine, qui constitue à l'époque un modèle d'étude pour les protéines membranaires. Cette découverte fait naître l'idée d'une famille de gènes codant pour des récepteurs membranaires et marque le début de l'ère des RCPG. Quelques années plus tard, l'avènement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit mène à la publication de plusieurs génomes (15), y compris le génome humain (16, 17). Ces techniques conduisent d'une part à l'identification de nouveaux sous-types de RCPG, et d'autre part à la description de polymorphismes génétiques en lien avec un récepteur et une pathologie donnée, ouvrant ainsi la porte au concept de médecine personnalisée. Enfin, les avancées récentes dans le domaine de la cristallographie aux rayons X, de la modélisation moléculaire et de l'ingénierie des protéines sont couplées à la bio-informatique et permettent l'émergence d'une nouvelle approche dans la découverte de candidats thérapeutiques, basée sur la structure. A l'heure actuelle, plus de cent structures tridimensionnelles (3D) de RCPG ont été obtenues par cristallographie (18, 19). Grâce à ce nombre important de structures disponibles, les modèles par homologie sont constamment améliorés. De plus, l'obtention de la structure de certains RCPG dans différents états d'activation ou couplés avec différents partenaires d'interaction offre une meilleure compréhension de la relation structure/fonction.

Avec une connaissance accrue de la structure des sites de liaisons de plusieurs RCPG avec leurs ligands ou leurs effecteurs, et des mécanismes de modulation de ces récepteurs, le criblage virtuel utilisant de larges bases de données a d'ores et déjà démontré son efficacité dans

le design rationnel de nouveaux composés (20, 21). Dans les prochaines années, ces nouvelles technologies devraient donc fortement participer au renouveau du portefeuille de candidats pharmaceutiques ciblant les RCPG. D'autre part, plusieurs avancées conceptuelles ont permis l'ouverture de nouvelles avenues thérapeutiques. Parmi celles-ci, la mise en évidence de la sélectivité fonctionnelle, où un ligand dit biaisé permet l'activation spécifique d'une ou de plusieurs voies de signalisation en aval d'un récepteur, offrant ainsi la possibilité d'une approche thérapeutique ciblant non seulement un récepteur donné mais aussi une voie de signalisation spécifique (22). Cette sélectivité fonctionnelle est d'autant plus intéressante dans un contexte où le nombre d'effecteurs activés en aval des RCPG est en constante progression, et où certains d'entre eux peuvent être activés à la fois de manière dépendante des protéines G ou des arrestines ; chacun de ces modes d'activation conduisant à une réponse physiologique différente. Enfin, le développement de modulateurs allostériques participe à l'amélioration de la sélectivité des candidats pharmaceutiques, en permettant de contourner la forte homologie de séquence des sites orthostériques observée parmi certains sous-types de récepteurs (23).

1.2. Structure des RCPG

1.2.1. La Rhodopsine : modèle d'étude prototypique de la structure des RCPG

La rhodopsine est un récepteur visuel des cellules de la rétine et appartient à la superfamille des RCPG. Dès les années 1960, des études localisent la rhodopsine sur la membrane externe des cellules en bâtonnets (24) et c'est en 1980, lors de la publication sa séquence complète, qu'est établie la présence de sept domaines TM hydrophobes. Cette protéine est alors décrite comme possédant une extrémité N-ter extracellulaire et C-ter cytoplasmique, toutes deux entourant la structure en serpentins des sept TM (25, 26). En 1993, Schertler et ses collègues publient la projection de la rhodopsine dans la bicouche lipidique et fournissent ainsi le premier modèle d'arrangement dans l'espace des hélices transmembranaires. Il s'ensuit un véritable bond en avant en l'an 2000, avec l'obtention de la première structure 3D à haute définition (2.8Å) de la rhodopsine publiée par Palczewski *et al.* (27). Cette découverte confirme le modèle des TM hélicoïdales ainsi que leur arrangement dans l'espace et donne un certain

nombre d'informations sur la structure des boucles intra- et extracellulaires, mais aussi sur les interactions intramoléculaires. Pendant plusieurs années, les découvertes faites sur le récepteur rhodopsine seront appliquées à d'autres RCPG en utilisant des modèles d'homologie de séquences participant ainsi à l'étude pharmacologique de plusieurs récepteurs et facilitant le développement de nouveaux ligands pour ces derniers (28). Bien que ces modèles soient supportés par de nombreuses évidences expérimentales, l'obtention de la structure d'un autre RCPG que la rhodopsine reste alors cruciale pour pouvoir les valider.

1.2.2. Caractéristiques structurales des RCPG

Le domaine de la biologie structurale des protéines membranaires présente de nombreux défis car ces protéines sont hydrophobiques et difficiles à extraire des membranes, mais aussi relativement flexibles et instables (29, 30). La première protéine membranaire a été cristallisée en 1985 (31), la rhodopsine en 2000 (27) et il faudra attendre encore sept années supplémentaires pour que le groupe du Dr. Brian Kobilka résolve la structure du récepteur β 2AR (32). Depuis, des progrès remarquables ont été faits dans le domaine afin de dépasser les obstacles liés à la cristallisation des RCPG : l'optimisation des méthodes d'expression et de stabilisation des protéines recombinantes, la synthèse de nouveaux détergents et le développement de stratégies de purification innovantes, couplés à l'utilisation des lignes de faisceaux de rayons-X microfocus des synchrotrons ont permis des percées majeures (29, 33). Ainsi, en 2015 les structures de 30 RCPG ont été résolues avec plus de 127 références disponibles (19) (Protein databank PDB (34)).

La cryo-microscopie électronique (cryo-EM) est un sous-domaine de la biologie structurale en pleine expansion. Cette technique permet d'observer des échantillons biologiques dans leur état natif, après vitrification à basse température. Bien que ne permettant pas d'atteindre le même niveau de résolution que les techniques de cristallographie, la cryo-EM permet d'obtenir une structure en l'absence de cristaux. Elle présente aussi l'avantage de donner accès à une population de particules dans différents états conformationnels, ensuite séparés et classés grâce à des algorithmes d'analyse d'images, permettant ainsi l'obtention d'informations à la fois sur l'architecture et la dynamique du macro-complexe. Lorsqu'il s'agit de transférer cette technique aux RCPG, la cryo-EM fait aussi face à certains défis (35). En effet, la petite

taille des complexes formés par les RCPG et leurs interacteurs (< 200 kDa) rend plus difficile l'alignement des milliers d'images à faible contraste. Dans ce cas, les biologistes structuraux se tournent parfois vers la microscopie électronique en transmission (TEM) avec coloration négative (35). Cette technique permet d'améliorer fortement le contraste mais sa résolution est limitée à 20 Å par les sels de métaux utilisés comme agents contrastants. Malgré leurs limitations, ces deux techniques ont permis l'obtention d'informations précieuses sur la structure de certains récepteurs en complexe en un interacteur, comme le complexe β 2AR/Gs (36) ou β 2AR/ β -arrestine-1 (37).

Les RCPG partagent plusieurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles [Figure 1]. Tout d'abord, les parties extracellulaires (N-ter et boucles extracellulaires) ainsi que les domaines TM sont impliqués dans la liaison du ligand alors que les parties intracellulaires (C-ter et boucles intracellulaires) interagissent avec les effecteurs de la signalisation cellulaire. Dans la plupart des structures obtenues, deux cystéines situées à l'extrémité de la boucle e1 et sur la boucle e2 forment un pont disulfure qui joue un rôle important dans la stabilisation de la conformation de la région extracellulaire et de la poche de liaison du ligand. Le C-ter présente souvent une courte hélice (hélice VIII) située quelques résidus après le TMVII et parallèle à la membrane. Après cette hélice, il y a un site potentiel de palmitoylation qui crée un point d'ancrage dans la membrane plasmique (38). Malgré une topologie structurelle similaire, certaines parties des RCPG divergent d'un récepteur à l'autre. Principalement, la longueur de l'extrémité N-ter varie de 4 à plus de 800 acides aminés, et la boucle e2 présente une grande variété de structures secondaires. L'arrangement du bouquet de TM au sein de la membrane plasmique diffère aussi d'un récepteur à l'autre, conduisant à d'importantes différences en termes de taille et de forme de la poche de liaison du ligand. Ces variations aux niveaux de la séquence/taille des extrémités et des boucles des récepteurs ont permis de mettre en place une classification et ainsi définir différentes familles de récepteurs.

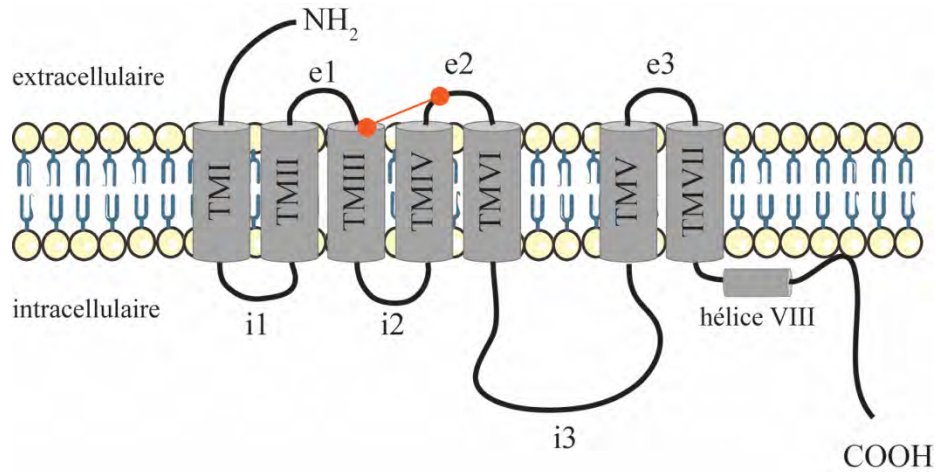


Figure 1. Représentation schématique d'un RCPG.

Les RCPG possèdent sept segments antiparallèles et hydrophobes (TMI-TMVII). Ces segments sont reliés par trois boucles intracellulaires (i1-i3) et extracellulaires (e1-e3). Un pont disulfure (*orange*) relie les boucles e1 et e2. L'extrémité N-ter (NH₂) est extracellulaire alors que l'extrémité C-ter (COOH) est intracellulaire. Une hélice VIII parallèle à la membrane est présente dans la partie C-ter de la plupart des RCPG et suivie d'un ancrage lipidique.

1.3. Classification des RCPG

La superfamille des RCPG regroupe plus de 800 récepteurs dont environ 450 récepteurs olfactifs. Plusieurs systèmes de classification ont été utilisés pour regrouper ces récepteurs en sous-familles. Un des premiers systèmes est introduit en 1994 par Kolakowski et sépare les récepteurs en sept groupes : A-F et O. Il est basé principalement sur des similarités de séquences (39). Cette classification servira de base au développement de la base de données GPCRDB qui divisent les RCPG en 6 classes (40), que nous détaillerons plus loin dans cette section. Un autre classement, proposé par Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin en 1999, repose sur le mode de liaison du ligand ainsi que sur certains critères structuraux pour séparer les RCPG en cinq classes (41). Enfin, suite à la publication du génome humain, émerge le système GRAFS qui s'appuie sur l'analyse phylogénétique des RCPG pour les répartir sur cinq groupes : G pour Glutamate, R pour Rhodopsine, A pour Adhésion, F pour Frizzled/Taste et S pour Sécrétine (42).

1.3.1. Le modèle de Kolakowski

Le classement selon Kolakowski (39) a été utilisé et adapté aux nouvelles connaissances afin de servir de support à la base de données GPCRDB qui regroupe des informations sur les structures cristallines, les séquences et mutations des RCPG.

La classe A « Rhodospin-like » regroupe près de 80% de l'ensemble des RCPG dont 390 récepteurs olfactifs. Les récepteurs de cette classe présente une extrémité N-ter assez courte et plusieurs séquences consensus : deux cystéines formant un pont disulfure entre les boucles e1 et e2, le motif E/DRY à l'extrémité du TMIII et le motif NPxxY dans le TMVII, qui jouent tous deux un rôle dans l'activation et la réponse à l'agoniste du récepteur (43, 44). Les récepteurs non-olfactifs de cette classe se lient principalement à des ligands de petites tailles tels que des amines biogènes, des peptides ou encore des substances apparentées aux lipides, qui se fixent directement au niveau des TM.

La classe B regroupe les récepteurs « Secretin-like » qui lient des peptides de grande taille tels que des hormones (ex. récepteur au glucagon) ou des neuropeptides (ex. récepteur de l'hormone de libération de l'hormone de croissance) et inclut aussi les récepteurs d'adhésion. Ces

récepteurs présentent une faible homologie avec les récepteurs de classe A. Ils présentent une longue extrémité N-ter caractéristique qui est impliquée dans la liaison du ligand au récepteur.

La classe C « Metabotropic Glutamate receptors-like » inclut les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs au calcium, les récepteurs GABAergiques de type b (GABA_B) et certains récepteurs aux phéromones de l'organe voméro-nasal. Cette classe se caractérise principalement par la présence d'un large domaine N-ter replié en deux lobes et qui forment le site de liaison du ligand. Par ailleurs, la formation d'un dimère est essentielle à l'activité de ces récepteurs.

Les classes D et E regroupent réciproquement les récepteurs aux phéromones de la reproduction fongique et les récepteurs à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et ne sont pas représentées chez l'Homme.

Enfin, la classe F rassemble les récepteurs homologues aux protéines « Frizzled/Smoothed » qui jouent un rôle crucial lors du développement animal en contrôlant la voie Wnt et donc de nombreux processus tels que : la polarité cellulaire, le développement embryonnaire et la prolifération cellulaire.

1.3.2. Le modèle GRAFS

Le modèle de classification GRAFS (42) est basé sur une analyse phylogénique à grande échelle de la plupart des RCPG du génome humain [Figure 2]. Ce système répartit les récepteurs en 5 familles : Glutamate (G), Rhodopsine (R), Adhésion (A), Frizzled/Taste2 (F), et Sécrétine (S). Une des principales différences entre la classification de Kolakowski et le système GRAFS est la séparation en deux familles « Adhésion » et « Sécrétine » des récepteurs auparavant regroupés au sein de la classe B.

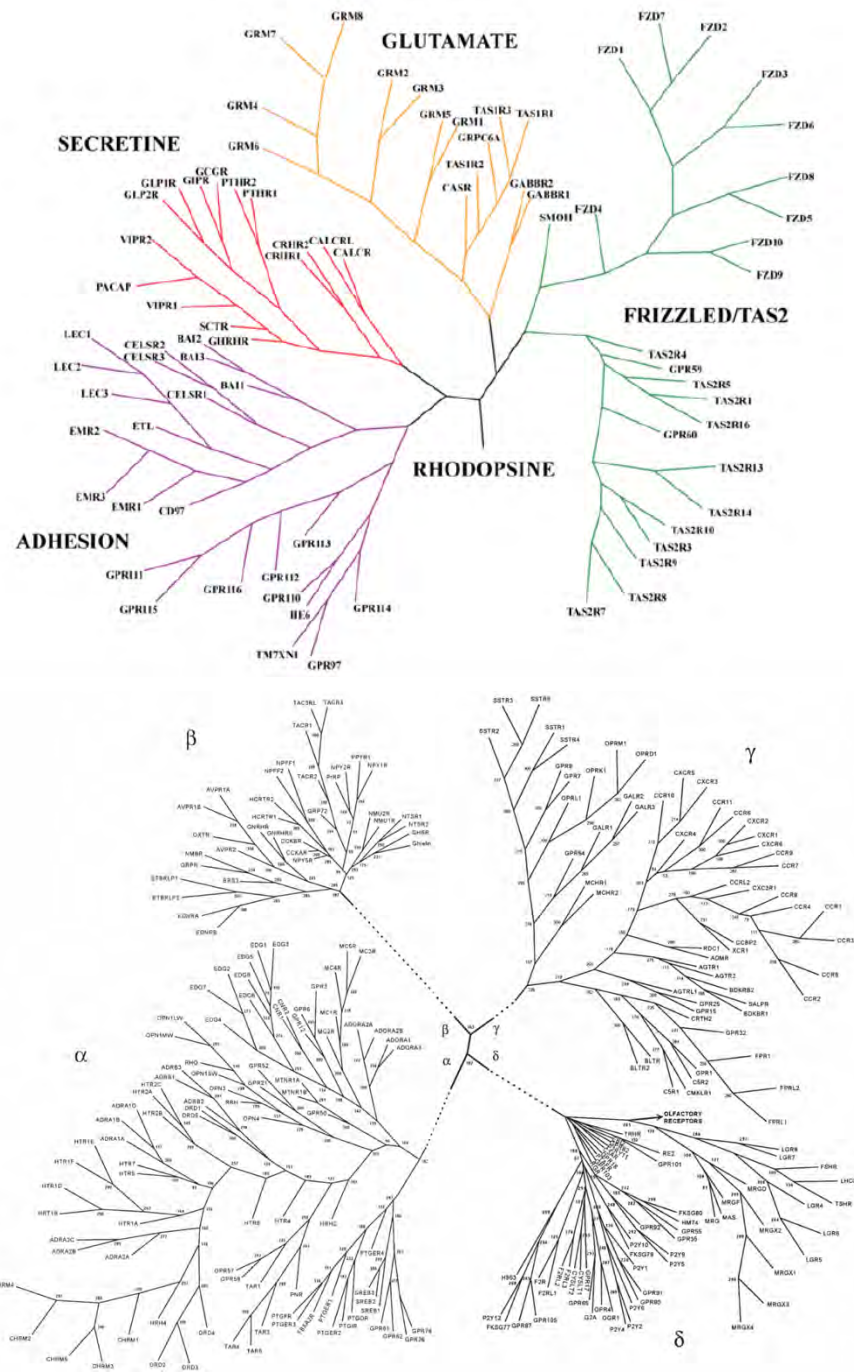


Figure 2. Classification des RCPG selon le modèle de GRAFS.

Les RCPG humains sont classés en cinq familles selon le degré de conservation des séquences de leurs domaines transmembranaires : Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste2 et Sécétine. La famille rhodopsine est subdivisée en 4 branches (α , β , δ , γ). Adaptée de (45).

1.4. Signalisation canonique des RCPG : les protéines G

1.4.1. Généralités

La partie extracellulaire du récepteur permet l'interaction avec le ligand et la partie transmembranaire transmet le signal d'activation jusqu'à la partie intracellulaire, où se fixe les effecteurs. C'est la liaison du ligand au RCPG qui induit un réarrangement des résidus au niveau des hélices transmembranaires, provoquant un changement de la conformation de la partie intracellulaire du récepteur, qui permet la liaison des effecteurs cytoplasmiques (46). Il en résulte l'engagement et l'activation des protéines G hétérotrimériques (46).

Les protéines G sont membres de la grande famille des protéines régulées par les nucléotides de type guanosine. À l'état inactif, les protéines G forment un hétérotrimère constitué d'une sous-unité $G\alpha$ liée au guanosine diphosphate (GDP), et des sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ qui forment un dimère constitutif appelé $G\beta\gamma$. Une fois stimulé par son ligand, le récepteur active de manière allostérique la protéine G en catalysant l'échange d'un GDP pour un GTP (guanosine triphosphate). Alors, les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ se séparent pour s'associer de manière indépendante à une grande variété d'effecteurs intracellulaires. Elles engagent diverses cascades de signalisation parmi lesquelles : l'adénylate cyclase, les phospholipases, les canaux ioniques, les protéines tyrosines kinases, les MAPK (mitogen-activated protein kinases), et bien d'autres (47).

Les sous-unités $G\alpha$ possèdent une activité GTPase intrinsèque qui permet leur inactivation et la reformation subséquente d'un hétérotrimère inactif. Diverses protéines régulatrices permettent soit d'accélérer la dégradation du GTP, soit d'empêcher la liaison de l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$ au récepteur activé et donc bloquer son activation par le récepteur. Ce dernier processus est appelé désensibilisation et sera discuté dans la section 2.3.

1.4.2. Signalisation des sous-unités $G\alpha$

Il y a 16 gènes $G\alpha$ dans le génome encodant pour 23 protéines (variants inclus) qui se divisent en quatre classes, en fonction de leur similarité de séquences (48) :

- **Classe des Gs** : $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha olf}$ (système olfactif)
- **Classe de Gi/o** : $G_{\alpha i_1}$, $G_{\alpha i_2}$, $G_{\alpha i_3}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha z}$, $G_{\alpha t_{rod}}$ (système visuel), $G_{\alpha t_{cone}}$ (système visuel) et $G_{\alpha gust}$ (système gustatif)
- **Classe de Gq** : $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$ et $G_{\alpha 15}$
- **Classe de G12/13** : $G_{\alpha 12}$ et $G_{\alpha 13}$

Les sous-unités G_{α} sont composées d'un domaine de liaison au nucléotide, très proche des Ras-GTPases, et d'un domaine en hélice α (49). Ces sous-unités possèdent 3 régions flexibles qui changent de conformation lors de la liaison d'un GTP (50). La forme G_{α} liée au GTP perd son affinité pour le dimère $G\beta\gamma$.

Chaque classe de G_{α} possède des cibles cellulaires bien définies [Figure 3] (48). Les protéines de la famille Gs (stimulatrice) activent l'adenylylate cyclase qui à son tour catalyse la production d'AMPc à partir d'adénosine tri-phosphate (ATP) (51). L'AMPc joue alors son rôle de messenger secondaire en stimulant plusieurs effecteurs parmi lesquels la protéine kinase dépendante du cAMP (PKA) qui phosphoryle plusieurs cibles dont les RCPG (51, 52) et différents régulateurs du métabolisme (53), et l'EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) qui agit comme agent d'échange dans l'activation de petites protéines G (54).

Au contraire, les protéines de la famille Gi (inhibitrice) réduisent la production d'AMPc (55). Dans le cas de $G_{\alpha i_{1/2/3/0/z}}$, cette inhibition se fait via une interaction directe entre la sous-unité $G_{\alpha i}$ et l'adenylylate cyclase (56). Le système visuel utilise les $G_{\alpha t}$, couplées à la rhodopsine, pour activer la fermeture des canaux échangeurs sodium Na^+/Ca^{2+} via la régulation des niveaux de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) par la phosphodiesterase PDE6 (57). Enfin les $G_{\alpha gust}$ ou gustducines, localisées dans les bourgeons gustatifs, permettent la transduction du goût sucré, amer et umami (58). La sous-unité $G_{\alpha gust}$ active l'hydrolyse de l'AMPc par une phosphodiesterase, ce qui libère les canaux inhibés par l'AMPc et élève la concentration intracellulaire de calcium (59).

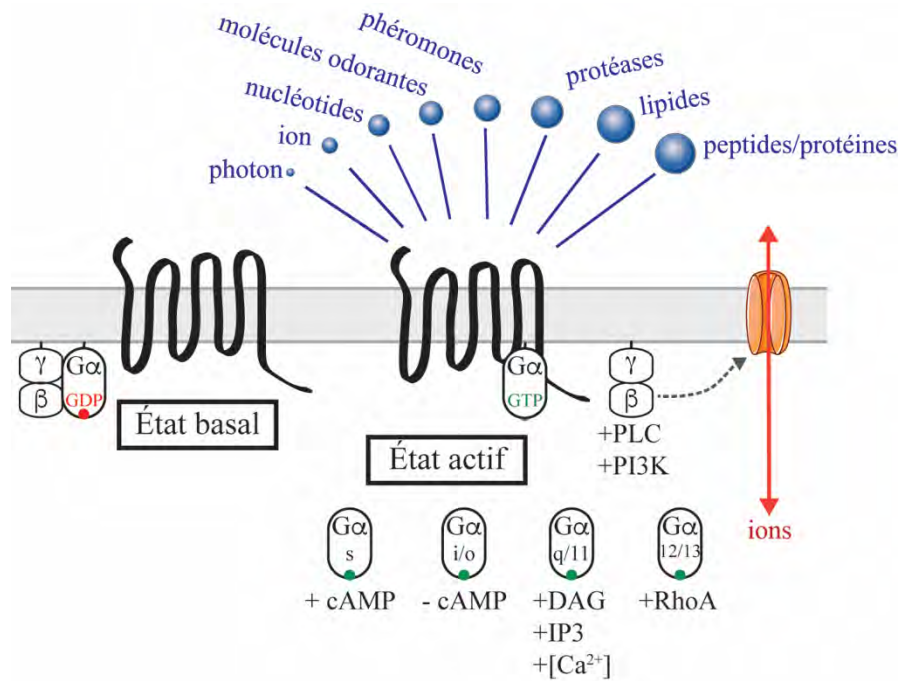


Figure 3. Activation des RCPG et signalisation par les protéines G

Les RCPG sont activés par une grande variété de stimuli allant des plus petits, comme les photons et les ions, jusqu'au plus gros, comme les lipides ou les protéines. Les RCPG transforment un stimulus en réponse cellulaire via l'activation des protéines G qui activent à leur tour différents effecteurs et entraînent la production de messagers secondaires. Chaque étape permet une amplification du signal. Chacune des familles de protéines G induit des cascades de signalisation qui lui sont propres, et seuls les effecteurs principaux de chaque sous-unité sont représentés ici.

Les membres de la famille Gq activent la phospholipase C β (PLC β) qui clive le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG) (60). Ces molécules agissent comme messagers secondaires en activant la protéine kinase C (PKC) et en induisant la relâche des stocks de calcium intracellulaire, respectivement.

Les protéines de la classe G12/13 régulent les petites GTPase de la famille RhoA via l'activation du facteur d'échange GDP/GTP RhoGEF (61). Elles ont pour rôle majeur la régulation de la réorganisation cytosquelette d'actine. Elles participent à l'adhésion et à la migration cellulaire et leur dérégulation est associée à la néoplasie (62).

1.4.3. Signalisation des sous-unités G $\beta\gamma$

Originellement, le dimère G $\beta\gamma$ est considéré comme la sous-unité inactivatrice de G α permettant la reformation de l'hétérotrimère qui, capable de se lier à nouveau au récepteur activé, peut enclencher le prochain cycle de signalisation (63). Toutefois, depuis 1997, de nombreux travaux ont permis de redéfinir G $\beta\gamma$ comme une unité centrale de la signalisation des RCPG.

Chez l'homme, il existe cinq sous-types de G β (G β 1-5) et douze sous-types de G γ (G γ 1-5,7-13) et donc un nombre important de combinaisons possibles (64). Le modèle classique d'activation des protéines G suggère une dissociation des sous-unités G α et G $\beta\gamma$, permettant la liaison d'effecteurs au niveau de surfaces d'interaction préalablement inaccessibles (65). Selon cette hypothèse, les protéines G α pourraient donc s'assembler avec différents dimères G $\beta_x\gamma_y$, lors de la reformation de l'hétérotrimère; chaque combinaison pouvant activer différents effecteurs de la signalisation (65). Un modèle alternatif propose que les changements conformationnels, induits par le récepteur activé sur l'hétérotrimère, entraînent l'exposition de nouvelles interfaces pour les effecteurs intracellulaires sans toutefois conduire à une dissociation complète des sous-unités α et $\beta\gamma$ (66, 67). Plusieurs études suggèrent même que ces modèles organisationnels ne sont pas mutuellement exclusifs et que l'un ou l'autre peut être mis en œuvre en fonction du récepteur et de la protéine G activés, ou qu'ils peuvent permettre d'engager des effecteurs différents (68).

Gβγ a historiquement été découvert comme activant le courant potassique rectifiant via les canaux GIRK (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels) (69, 70). Son rôle dans l'inhibition des canaux calcium dépendant du voltage a aussi été démontré (71) ainsi que dans l'activation de certains isoformes de PLC (PLCβ, ε et η) (72), de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (73) et des MAPK (72). Enfin, Gβγ module l'activité de certains isoformes de l'adénylate cyclase (73, 74).

1.4.4. Mécanismes moléculaires d'activation des protéines G

L'obtention des structures du complexe β2AR/Gs par cryo-EM et cristallographie (32) ont permis de visualiser pour la première fois l'ensemble des mécanismes de propagation transmembranaire du signal d'activation d'un RCPG [Figure 4]. Les plus grands changements conformationnels proviennent de l'ouverture du TMVI (14 Å) et d'une extension en hélice-α de l'extrémité cytoplasmique du TMV. L'état actif de β2AR est stabilisé par une importante surface d'interaction avec la sous-unité Gαs. Il n'y a pas d'interaction directe entre le récepteur et la sous-unité Gβ ou Gγ. L'hélice α5 de Gαs s'insère dans une cavité formée suite à l'ouverture des TMIV et TMV. Plusieurs résidus de cette hélice forment alors des interactions avec le cœur transmembranaire du récepteur. En particulier, la Tyr391 de Gαs forme un lien polaire à la fois avec l'Arg131 du motif DRY (TMIII) et avec la Tyr326 de la séquence NPxxY (TMVII), ces deux motifs étant fortement conservés au sein de la classe A des RCPG (voir section 1.3.1). Le mouvement de l'hélice α5 de Gαs libère l'accès à la poche de liaison du nucléotide favorisant l'échange d'un GDP pour un GTP et ainsi l'activation allostérique de la protéine G par le récepteur activé.

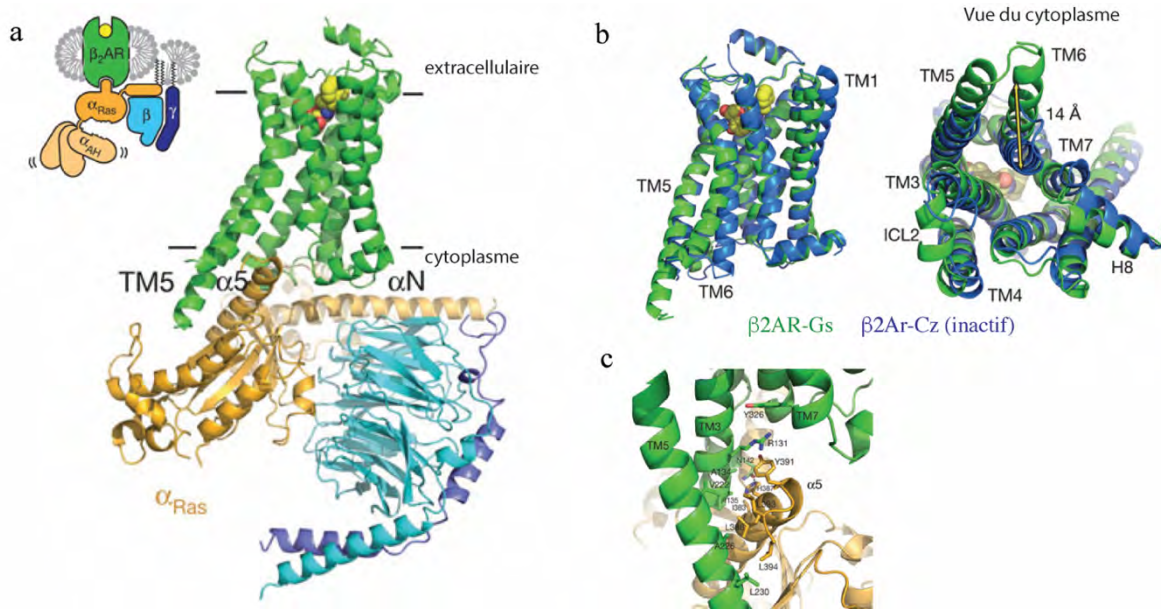


Figure 4. Structure active et inactive du complexe β 2AR/Gs.

A. Le complexe β 2AR/Gs est purifié en absence de nucléotide dans des micelles. La sous-unité $G\alpha_s$ est composée de deux domaines : le domaine Ras (α Ras) et le domaine en hélice α (α AH). En l'absence de nucléotide, le domaine α AH est mobile par rapport au domaine α Ras. Le complexe est orienté dans la membrane plasmique. Le récepteur β 2AR (*vert*) est lié à un agoniste (*sphères jaunes*) et engagé avec $G\alpha_s$ (*orange*). $G\alpha_s$ est associée à $G\beta$ (*cyan*) et $G\gamma$ (*violet*) pour former le complexe hétérotrimérique Gs. Le nanobody Nb35 qui se lie aux sous-unités α et β , et le lysozyme T4 fusionné au N-ter du β 2AR sont utilisés pour stabiliser le complexe et permettre sa cristallisation (non représentés).

B. Vue de côté et vue depuis le cytoplasme de la structure du complexe β 2AR/Gs (*vert*) superposée à la structure du β 2AR inactif lié au carazolol (*bleu*). Des changements structuraux majeurs sont observés au niveau de la partie intracellulaire des domaines TM5 et TM6. Le TM5 s'étend vers le domaine cytoplasmique par deux tours d'hélice et le TM6 se déplace de 14 Å vers l'extérieur (entre les résidus Glu268 des deux structures, *flèche jaune*).

C. L'hélice α 5 de $G\alpha_s$ s'arrime dans une cavité formée au niveau de la face intracellulaire du récepteur suite à l'ouverture de ces hélices TM5 et TM6. Les interactions sont principalement non-polaires, sauf la Tyr 391 de l'hélice α 5 de $G\alpha_s$ avec l'Arg131 du motif DRY du TM3. Cette Arg131 interagit aussi avec la Tyr326 du motif conservé NPxxY du TM7. Adaptée de (32).

La dynamique structurelle de l'activation du récepteur β 2AR a été confirmée quelques années plus tard avec l'obtention de la structure de la forme active du récepteur muscarinique M2R (75) et du récepteur aux opioïdes μ OR (76). On retrouve l'ouverture des TMVI et V ainsi que le réarrangement des motifs DRY et NPxxY. En particulier, la Tyr 440¹ du motif NPxxY et la Tyr206¹ dans son voisinage immédiat interagissent via un lien polaire certainement médié par une molécule d'H₂O. Des études mutationnelles ont démontré l'importance de cette liaison dans la stabilisation de la conformation active du récepteur formant un « verrou » ionique stabilisant l'ouverture du TMVI. La position relative de ces deux Tyr est conservée dans les structures actives de la rhodopsine, de β 2AR, de M2R et de μ OR. Ce mécanisme peut donc être considéré comme caractéristique de l'activation des récepteurs de classe A.

2. Arrestines : régulateurs de la signalisation et du trafic des RCPG

2.1. Généralités

Les protéines arrestines ont été identifiées comme des régulateurs de l'activité des RCPG d'abord dans le système visuel par le groupe de Hermann Kühn en 1986 (77), puis avec le récepteur β 2AR par le groupe de Robert Lefkowitz en 1990 (78).

Chez l'Homme et les autres mammifères, il existe quatre sous-types de la protéine arrestine :

- Arrestine-1 et arrestine-4 se lient à la forme activée par la lumière et phosphorylée du récepteur rhodopsine. Arrestine-1 est exprimée en quantité comparable dans les cellules visuelles en cônes et en bâtonnets alors que arrestine-4 ne se retrouve que dans les premières.
- Arrestine-2 et arrestine-3 (ou β -arrestine-1 et β -arrestine-2) sont ubiquitaires. Même si elles ont d'abord été découvertes comme interacteurs du récepteur β 2AR, il est clair

¹ Numérotation selon la séquence du récepteur M2R

aujourd'hui que cette interaction s'étend à la plupart des RCPG. Arrestine-2 présente 59% d'homologie avec arrestine-1.

Les arrestines sont des protéines dépourvues d'activité catalytique qui fonctionnent comme des protéines d'échafaudage pour l'assemblage de complexes protéiques ou signalosomes (79). Originellement, les arrestines sont identifiées comme acteur central de la désensibilisation (découplage du complexe protéine G/récepteur) et de l'internalisation des RCPG. Cependant, nous verrons tout au long des deux prochains chapitres que les arrestines participent aussi à l'activation directe de voies de signalisation, ainsi qu'à plusieurs processus de régulation des RCPG.

2.2. Les arrestines dans différents organismes modèles

Plusieurs organismes modèles ont été invalidés (*knockout*, KO) pour un ou plusieurs sous-types d'arrestines afin d'étudier le rôle de ces protéines *in vivo*. De nombreux invertébrés expriment les protéines arrestines, parmi lesquels les organismes modèles *Caenorhabditis elegans* (80) and *Drosophila melanogaster* (81). La mutation des deux arrestines visuelles, *Arr1* et *Arr2*, chez *D. melanogaster* apporte la première confirmation *in vivo* que ces protéines inactivent le récepteur à la rhodospine et stoppent la phototransduction (82). La suppression du gène *kurtz*, le seul sous-type d'arrestine non-visuelle exprimé chez *D. melanogaster*, est létal en raison de son rôle essentiel dans le système nerveux central lors du développement (83). La délétion de *ARR-1*, unique arrestine exprimée chez *C. elegans*, met en évidence son rôle dans la régulation de la signalisation des protéines G dans le système neuronal, ainsi que son importance dans l'adaptation et la récupération du système olfactif (80).

Les vertébrés possèdent tous des arrestines visuelles et non-visuelles (84). Les arrestines visuelles *Arr3a* et *Arr3b* du poisson zèbre, exprimées dans les cônes et donc homologues de l'arrestine-4 humaine, permettent une bonne résolution temporelle de la vision via une récupération plus rapide de la photo-réponse après activation des récepteurs (85). Quant à la β -arrestine-2 non-visuelle, les travaux publiés par Wilbanks et *al.* montrent son rôle dans l'internalisation du récepteur Smoothened qui active la voie Hedgehog lors du développement

du poisson zèbre (86). Ces résultats corrént avec les données obtenues dans des cellules de rein embryonnaire humain (HEK293) (87).

Des KO individuels β -arrestine-1 et β -arrestine-2 ont été générés chez la souris (88, 89). Il est intéressant de noter que les souris KO pour β -arrestine-1 ou β -arrestine-2 ne présentent pas de phénotype majeur alors que les souris double KO pour β -arrestine-1/2 meurent au stade embryonnaire, ce qui suggère une redondance de fonction entre ces deux protéines (90).

2.3. Activation et changements conformationnels

Les structures cristallines des quatre sous-types d'arrestine à l'état basal ont été résolues (arrestine-1 (91, 92), arrestine-2 (93, 94), arrestine-3 (95), arrestine-4 (96)). Elles montrent un squelette structural similaire qui est de forme allongée et composé d'un double β -sandwich à sept feuillets formant deux lobes qui entourent un cœur polaire. Les lobes, appelés N-domaine et C-domaine, sont reliés entre eux par un bras d'une dizaine d'acides aminés qui constitue la région charnière ou « hinge domain ». Les extrémités N-ter et C-ter ne sont pas structurées et le C-ter est enfoui dans le N-domaine. Des mutations perturbant cette interaction ou le cœur polaire de la molécule ont un impact sur la liaison d'arrestine aux RCPG, ce qui démontre l'importance de ces motifs structuraux dans son mécanisme moléculaire d'activation (97-101).

2.3.1. Le senseur phosphate

Deux ensembles d'interactions intramoléculaires entre les deux lobes d'arrestine permettent le maintien de la conformation inactive de la protéine (102, 103): le cœur polaire, constitué de résidus chargés et qui est maintenu par des ponts salins formés entre Arg169/393² et Asp290/297², ainsi que la région aux 3 éléments formée par l'interaction tripartite du feuillet β XX de l'extrémité C-ter avec le feuillet β I et l'hélice α 1 amphipathique du N-domaine [Figure 5].

² Numérotation selon la séquence de β -arrestine-1

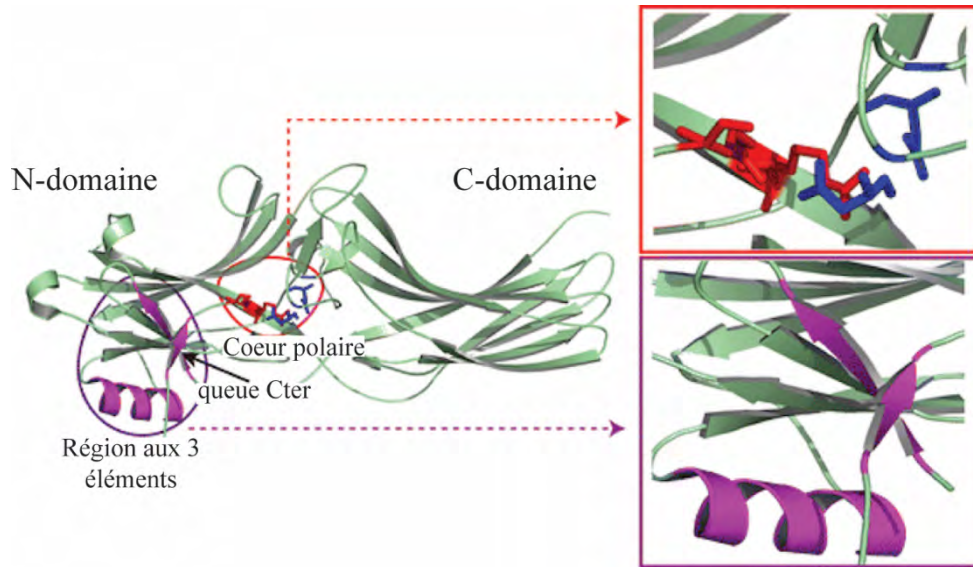


Figure 5. Structure aux rayons-X d'arrestine-2 inactive (PDB 1G4R).

Structure inactive d'arrestine-2 avec la région aux 3 éléments (*violet*) et le cœur polaire (*rouge*). Les résidus Arg du cœur polaire sont représentés avec des bâtonnets *rouges* et les Asp des bâtonnets *bleus*. Adaptée de (104).

L'activation des arrestines est provoquée par l'interaction de la queue C-ter d'un RCPG sous sa forme phosphorylée (active) avec le N-domaine de l'arrestine. Ces résidus phosphorylés interagissent avec le cœur polaire d'arrestine, déstabilisant celui-ci ainsi que la région aux 3 éléments, ce qui provoque la libération de la queue C-ter d'arrestine (102, 103). Plusieurs sites d'interactions d'arrestine avec des effecteurs, tels que les protéines de la machinerie d'endocytose, sont alors exposés. L'activation d'arrestine peut être déclenchée par un peptide phosphorylé dérivé de la queue C-ter du récepteur à la vasopressine V2R (V2R phosphopeptide ou V2Rpp) (105). Cette astuce a été utilisée en 2013 afin d'obtenir la structure de la forme active de β -arrestine-1 (106). La même année a été publiée la structure d'une forme mutante pré-activée d'arrestine-1 (p44), dans laquelle les 35 derniers acides aminés (soit l'extrémité C-ter) sont remplacés par une alanine, et qui lie de manière constitutive le récepteur à la rhodopsine non phosphorylé (107).

Plus récemment, la structure du complexe rhodopsine/arrestine-1 a été résolue (108). Ces trois structures ont confirmé l'existence d'un senseur phosphate. De manière surprenante, V2Rpp n'interagit pas directement avec le cœur polaire d'arrestine. À la place, le cœur polaire est déstabilisé suite à une distorsion de la boucle *lariat* (résidus 282-309) (93), à l'interface du N- et du C-domaine) et le phosphopeptide prend la place de l'extrémité C-ter d'arrestine au niveau du N-domaine, formant ainsi des interactions de charge avec le feuillet β I de la région aux 3 éléments. Plus précisément, le résidu Lys294 de la boucle *lariat* interagit avec le résidu T360 phosphorylé de la queue C-ter du V2R. Cette distorsion de la boucle éloigne les résidus Asp290 et Asp297 du cœur polaire, entraînant une rupture des liaisons hydrogènes. De plus, l'interaction des Ser/Thr phosphorylées de la queue C-ter de V2R avec les Lys10, Lys11 et Lys107 du motif aux 3 éléments d'arrestine déplace le feuillet β XX de l'extrémité C-ter, perturbant là-aussi le cœur polaire de la molécule.

En résumé, les études faites sur les structures des formes actives d'arrestines ont donc permis de définir un senseur phosphate constitué des feuilletts β I-III, de l'hélice α 1 et de la boucle *lariat* [Figure 6].

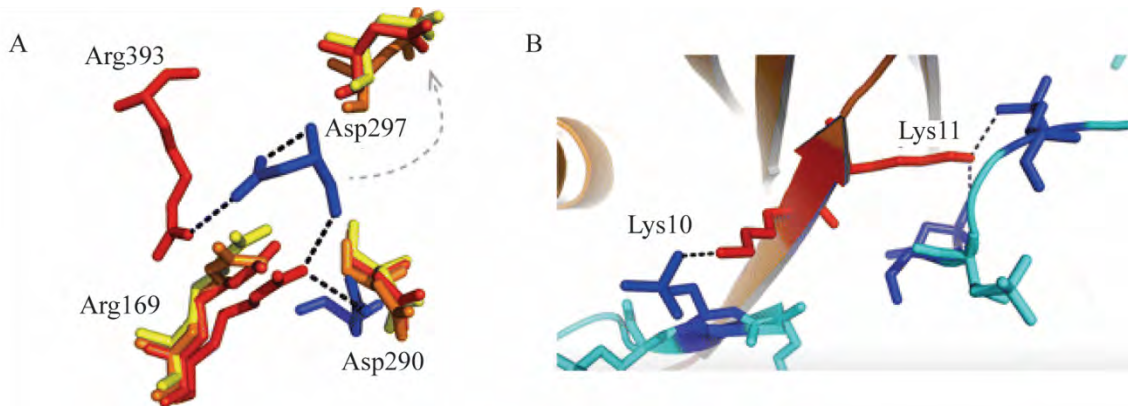


Figure 6. Les senseurs phosphate.

A. Liens hydrogènes du cœur polaire. Les résidus Arg du cœur polaire de la structure inactive d'arrestine-2 (PDB 1G4R) sont représentés avec des bâtonnets *rouges* et les Asp en *bleu*. Les résidus Arg et Asp de la forme pré-activée d'arrestine p44 (PDB 4J2Q), d'arrestine-2 liée au peptide C-ter phosphorylé de V2R (PDB 4JQI), et d'arrestine-1 en complexe avec rhodopsine (PDB 4ZWJ) sont représentés respectivement avec des bâtonnets *jaunes*, *orange* et *rouges*. Les liens hydrogènes dans le cœur polaire de la forme inactive d'arrestine-2 sont montrés en pointillés noirs et sont rompus dans la forme active des arrestines.

B. Liens hydrogènes entre les lysines (bâtonnets *rouges*) du feuillet β I d'arrestine-2 et les groupements phosphates de la queue C-ter de V2R (bâtonnets *bleus*) (PDB 4JQI). Adaptée de (104).

2.3.2. Le senseur d'activation

Plusieurs études suggèrent que les arrestines contiennent non seulement un senseur phosphate mais aussi un senseur d'activation (102, 109). En dehors du senseur phosphate, d'autres régions montrent un déplacement lors du passage de la conformation inactive à la conformation active : les boucles centrales (boucles *finger*, *middle* et *lariat*) et les feuillets β IV-V et β XII-XVI sont dynamiques ; et on constate aussi une rotation d'environ 20° de la position relative du N-domaine par rapport au C-domaine.

La boucle finger

L'échange hydrogène/deutérium associé à la spectrométrie de masse (HDX-MS) permet l'identification assez précise de régions protéiques impliquées dans des changements de conformation ou des interactions avec des partenaires. Cette technique a été utilisée par le groupe de Robert Lefkowitz (37) et montre une réduction significative de l'incorporation de deutérium au niveau des boucles centrales, principalement la boucle *finger*, lorsqu'ils comparent le complexe β 2V2R³/ β -arrestine-1 au V2Rpp/ β -arrestine-1. Cela signifie que lors de l'activation de β -arrestine-1 avec V2Rpp, ces boucles sont exposées au solvant, mais qu'en complexe avec le récepteur pleine longueur, elles se retrouvent enfouies, probablement en formant une interaction avec le récepteur. Cette hypothèse est consistante avec des données obtenues par mutation fonctionnelle, spectrométrie par résonance paramagnétique électronique (DEER), et marquage fluorescent qui supportent elles-aussi l'interaction de la boucle *finger* avec le récepteur activé (110-114). Par la suite, la structure cristallographique de la rhodopsine en complexe avec la boucle *finger* d'arrestine-1 montre l'insertion de cette boucle dans le noyau central du récepteur (115). Enfin, ces résultats sont confirmés par l'étude du cristal rhodopsine/arrestine-1 obtenue en 2015 (108) qui montre la boucle *finger* formant une hélice α qui s'insère dans le cœur de la rhodopsine et entre en contact avec la boucle i1, le TMVII et l'hélice α 8 du récepteur.

³ β 2V2R correspond au récepteur β 2AR dans lequel la queue C-ter de β 2AR a été tronquée et remplacée par V2Rpp (soit la queue C-ter phosphorylée du récepteur V2R)

La boucle middle

Les cristaux de p44 et β -arrestine-1/V2Rpp ainsi que des études HDX-MS montrent un mouvement de la boucle *middle* lors de l'activation d'arrestine (106, 107, 109, 116). Des études mutationnelles prouvent l'importance de cette boucle dans le maintien de la sélectivité d'arrestine-1 pour la forme activée du récepteur, en limitant sa liaison de celle-ci à la rhodopsine inactive (117). Là encore, ces données sont confirmées par l'analyse de la structure du complexe rhodopsine/ β -arrestine-1 qui montre un espacement de la boucle *middle* et de la boucle *ariat* apportant l'espace nécessaire à l'insertion de la boucle i2 du récepteur [Figure 7].

Liaison séquentielle arrestine/récepteur

Les résultats de microscopie électronique (EM) obtenus par Arun Shukla et ses collègues permettent de visualiser le complexe β 2V2R/ β -arrestine-1 (37). Ce complexe se retrouve sous deux conformations majoritaires : la première où β -arrestine-1 est suspendue par un seul point d'ancrage au récepteur, et la deuxième où l'interface d'interaction entre β -arrestine-1 et le récepteur est beaucoup plus étendue. Selon les auteurs, la première conformation correspond à une étape intermédiaire de basse affinité dans la formation du complexe arrestine/récepteur où seul le N-domaine d'arrestine interagit avec la queue C-ter du récepteur β 2V2R phosphorylé. La deuxième conformation correspond quant à elle l'engagement complet et de haute affinité d'arrestine avec le récepteur qui implique aussi l'insertion de la boucle *finger* dans le cœur du β 2V2R. Dans cette conformation pleinement active, l'arrestine forme un « chapeau » sur la partie intracellulaire du récepteur et empêche l'interaction avec les protéines G [Figure 8].

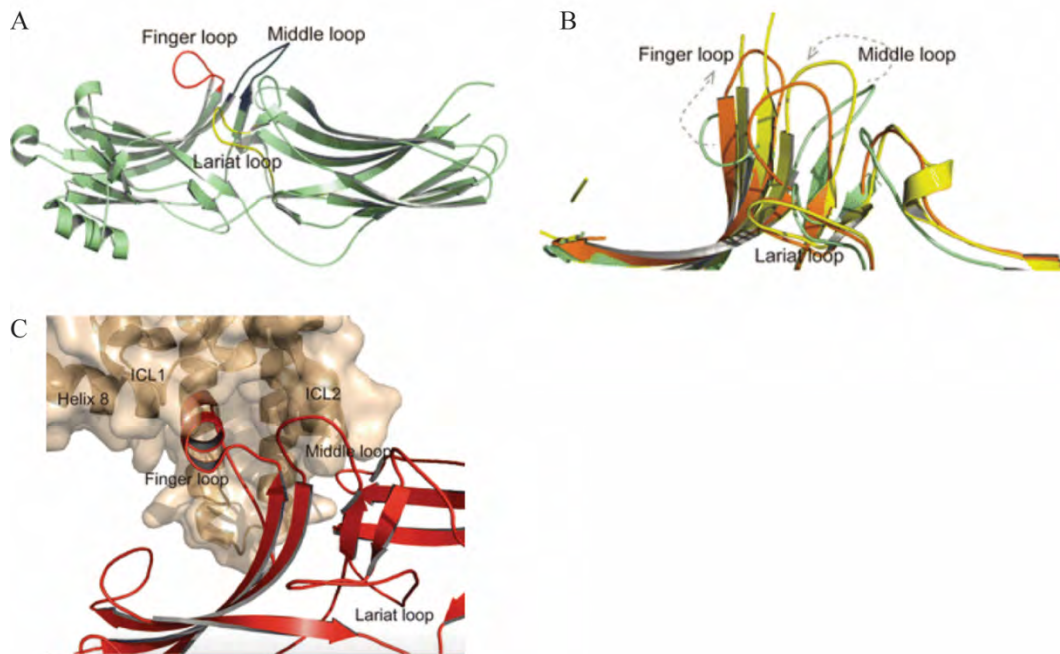


Figure 7. Réarrangement des boucles centrales lors de l'activation d'arrestine

A. Localisation des trois boucles dans la structure de β -arrestine-1 inactive (PDB 1G4R).

B. Position relative de chaque boucle dans la structure de β -arrestine-1 inactive (*vert*, PDB 1G4R), de p44 (*jaune*, PDB 4J2Q), du complexe V2Rpp/ β -arrestine-1 (*orange*, PDB 4JQI).

C. Position des boucles *finger* et *middle* dans le complexe rhodopsine/arrestine-1 (PDB 4ZWJ).

Adaptée de (104).

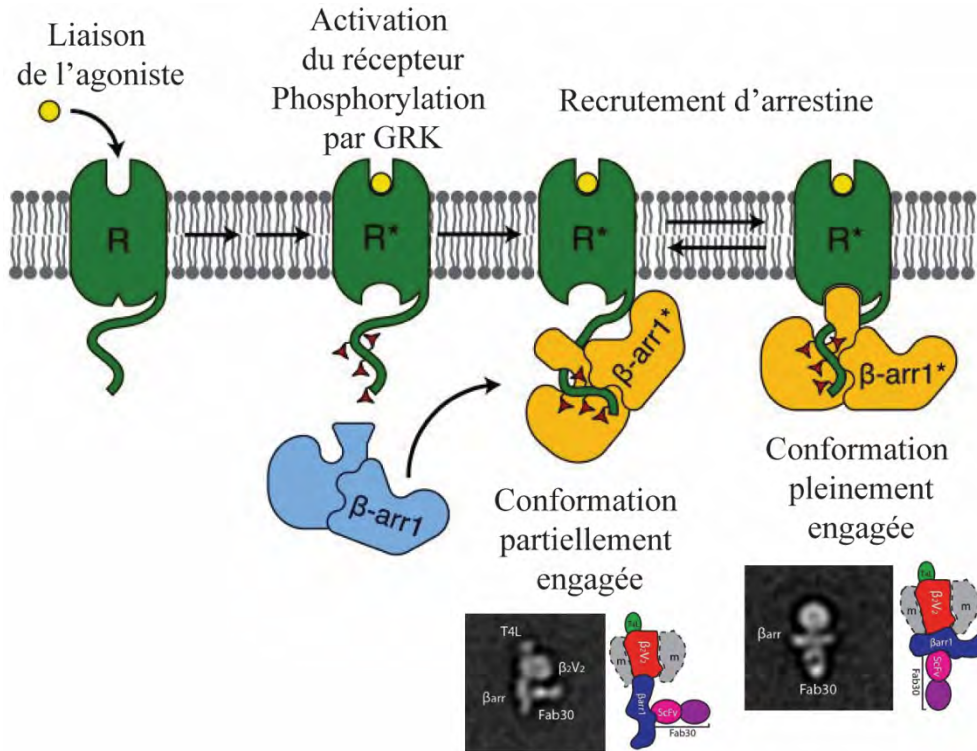


Figure 8. Engagement de β -arrestine-1 au récepteur β 2V2R

Suite à son activation par l'agoniste, le récepteur est phosphorylé par les kinases des RCPG (GRK) et recrute arrestine. Arrestine se lie au récepteur en 2 étapes : interaction de faible affinité avec le C-ter phosphorylé du récepteur correspondant à une conformation partiellement engagée puis engagement de la boucle *finger* dans le cœur du récepteur pour adopter une conformation pleinement engagée de haute affinité. (En bas) Représentation d'une moyenne d'images obtenues par EM du complexe natif T4L- β 2V2R- β arrestine-1-Fab30/ScFv30 montrant la conformation partiellement engagée (*gauche*) et pleinement engagée (*droite*) d'arrestine au récepteur. Adaptée de (37, 106).

2.4. Désensibilisation des RCPG

Les RCPG, une fois activés par un agoniste, fonctionnent comme des facteurs d'échange de nucléotides de guanine (GEF) pour les protéines G. Une fois dissociées, les sous-unités $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ régulent l'activité enzymatique de nombreux effecteurs (voir section 1.4). En parallèle, la stimulation du récepteur enclenche un mécanisme de régulation négative qui va permettre de contrôler la durée de l'activation des protéines G. Ce processus est appelé désensibilisation [Figure 9]. Malgré la diversité des voies de signalisation activées par ces récepteurs, le mécanisme de désensibilisation est universel et implique l'action coordonnée de protéines kinases et des arrestines. La désensibilisation englobe plusieurs processus : le découplage du récepteur et des protéines G, l'internalisation des récepteurs depuis la surface de la cellule vers des compartiments intracellulaires, la dégradation lysosomale des récepteurs et la baisse de la synthèse *de novo* de molécules de récepteurs. La signalisation des RCPG peut aussi être stoppée directement au niveau des protéines G. Par exemple, les protéines régulatrices de la signalisation des protéines G (RGS) accélère l'hydrolyse du GTP en GDP atténuant ainsi la signalisation (118, 119). Avant tout considéré comme un mécanisme d'atténuation de la signalisation des RCPG, il est aujourd'hui évident que la désensibilisation des RCPG permet aussi l'enclenchement de voies de signalisation non-canoniques qui seront discutées plus bas.

2.4.1. Désensibilisation dépendante de la phosphorylation

La désensibilisation commence quelques secondes après l'activation du récepteur. La première étape correspond à la phosphorylation des boucles cytoplasmiques et de la queue C-ter par des kinases intracellulaires. Cette phosphorylation peut être effectuée par les kinases des RCPG (GRK) ou les protéines kinases dépendantes des seconds messagers (121).

Phosphorylation du récepteur par les kinases dépendantes des seconds messagers ou désensibilisation hétérologue

Les kinases dépendantes des seconds messagers, telles que PKA ou PKC, phosphorylent les RCPG au niveau de séquences consensus situées sur les boucles intracellulaires du récepteur

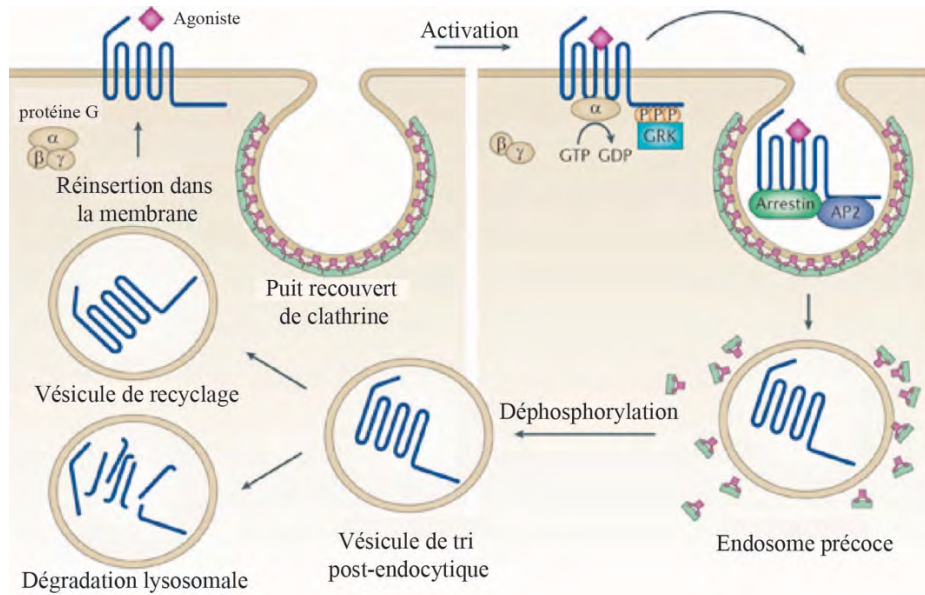


Figure 9. Cycle d'activation et désensibilisation d'un RCPG

Après activation par le ligand, le récepteur active rapidement les protéines G qui engagent différentes cascades de signalisation. La liaison du ligand déclenche aussi le recrutement des GRK et la phosphorylation du récepteur qui conduisent à la désensibilisation et à l'internalisation de celui-ci, suivies selon le récepteur, de son recyclage à la membrane ou de sa dégradation lysosomale. Adaptée de (120).

et sur son extrémité C-ter et empêchent l'activation des protéines G (121, 122). Contrairement aux GRK, les kinases dépendantes des seconds messagers ne font pas la discrimination entrerécepteurs occupés par un ligand ou non. Par conséquent, elles préviennent l'activité des récepteurs actifs et inactifs, d'où le terme de désensibilisation hétérologue. Des études montrent que le mécanisme de désensibilisation hétérologue ne nécessite pas le recrutement d'arrestine au récepteur pour permettre le découplage des protéines G (121).

Dans certains cas, la phosphorylation du récepteur par PKA ou PKC stimule un échange de couplage de la protéine G au niveau du récepteur. Par exemple, une fois activé le récepteur β 2AR engage Gs qui active l'adenylate cyclase et PKA. En plus de conduire à la production de seconds messagers, PKA phosphoryle le récepteur (123) ce qui altère le couplage Gs et promeut le couplage Gi, désensibilisant ainsi la signalisation Gs (124-127).

Phosphorylation du récepteur par les GRK ou désensibilisation homologue

La famille des GRK est composée de sept membres (128). GRK1 et 7 sont exprimées uniquement dans le système visuel. GRK2, 3, 5 et 6 sont exprimées de manière ubiquitaire. GRK4 est exprimée uniquement dans les testicules. GRK2 et 3 possèdent un domaine de liaison à G $\beta\gamma$ qui permet leur recrutement à la membrane plasmique après activation du récepteur et séparation des sous-unités G α et G $\beta\gamma$ (129). GRK1, 4, 6 et 7 sont adressées à la membrane par modifications post-transcriptionnelles (GRK1: farnésylation, GRK4/6: palmitoylation, GRK7: geranylgeranylation) et GRK5 par interaction entre des résidus négativement chargés de son domaine C-ter et des phospholipides (130).

Contrairement aux kinases dépendantes des seconds messagers, les GRK phosphorylent de manière spécifique les récepteurs activés par leur ligand : c'est la désensibilisation homologue (121). Tout comme PKA et PKC, les GRK phosphorylent le récepteur sur des résidus sérine ou thréonine des boucles intracellulaires et de l'extrémité C-ter. En revanche, la phosphorylation du récepteur par les GRK a peu d'effet sur le couplage récepteur/protéine G en l'absence d'arrestine. Plus précisément, la phosphorylation par les GRK permet l'augmentation de l'affinité d'arrestine pour le récepteur activé et le recrutement d'arrestine provoque alors le découplage par effet stérique.

Importance de la phosphorylation des RCPG pour l'interaction avec arrestine

Les RCPG fonctionnent comme des protéines d'échafaudage dynamiques dont le spectre de protéines d'interaction est influencé à la fois par des changements conformationnels et par des modifications post-transcriptionnelles. Dans le cas de l'interaction avec arrestine, la phosphorylation du récepteur joue un rôle central.

Dans le système visuel, la relation de cause à effet entre la phosphorylation et l'interaction du récepteur avec arrestine est évidente. En effet, des études *in vitro* montrent que la phosphorylation de résidus Ser/Thr bien définis sur la queue C-ter du récepteur rhodopsine augmente par dix fois l'affinité d'arrestine pour le récepteur activé par la lumière (131-133). En revanche, pour les arrestines non visuelles (β -arrestine-1/2), la phosphorylation du récepteur n'augmente pas de manière aussi drastique l'affinité d'arrestine pour ce dernier. En général, l'affinité de β -arrestine-1/2 pour le récepteur activé phosphorylé, plutôt que pour sa forme inactive, est seulement 2 à 3 fois plus élevée (134). Donc, malgré une conservation des principales caractéristiques du modèle liaison des arrestines visuelles et non visuelles au récepteur, le niveau de sélectivité fonctionnelle n'est pas conservé.

Contrairement à arrestine-1 et arrestine-4, β -arrestine-1 et β -arrestine-2, sont amenées à interagir avec 600 à 800 récepteurs différents qui présentent une homologie de séquence faible au niveau de leurs domaines intracellulaires. De plus, les patrons de phosphorylation peuvent grandement varier d'un récepteur à l'autre, avec des sites de phosphorylation principalement situés au niveau de l'extrémité C-ter et la boucle i3, et occasionnellement sur les boucles i1 et i2 (135). Enfin, ces événements de phosphorylation sont médiés par différentes kinases. Cette hétérogénéité résulte en toute une gamme d'affinité des β -arrestines pour les RCPG activés et phosphorylés (135). Cela a conduit à la séparation des récepteurs en deux classes distinctes : les récepteurs de classe A, tel que le récepteur V2R, présentent une forte affinité pour β -arrestine qui permet le maintien du complexe lors de l'internalisation, alors que les récepteurs de classe B, tel que le récepteur β 2AR, ont une affinité plus faible qui entraîne une dissociation plus rapide du complexe arrestine/récepteur (136).

Finalement, pour certains récepteurs, la phosphorylation n'est pas un critère essentiel pour l'interaction avec β -arrestine. C'est le cas des récepteurs à la substance P (136), lutropine (137), leukotriène B4 (138), orexine-1 (139) et PAR-2 (140) où les formes mutantes non phosphorylables ne perdent pas leur capacité d'interaction avec arrestine. Dans le cas de ces récepteurs, il a été émis l'hypothèse que chaque interaction entre le récepteur et arrestine est, prise individuellement, de faible affinité mais que la somme de ces interactions est suffisante pour permettre la formation du complexe, même en l'absence de phosphorylation (109). De plus, pour certains de ces récepteurs, la présence de résidus chargés négativement au niveau de la queue C-ter pourrait agir comme un phosphomimétique (141). Par exemple, un résidu Asp sur la boucle i3 du récepteur à la lutropine interagit avec le senseur phosphate de β -arrestine et participe à la désensibilisation et l'internalisation indépendante de la phosphorylation du récepteur (137).

Spécificité d'action des différentes kinases

De par les différentes kinases, mais aussi les différents sites de phosphorylation, la liaison des arrestines aux RCPG se doit de présenter une grande flexibilité, laissant supposer que c'est le nombre de charges négatives dans certains domaines intracellulaires du récepteur qui importe, plus que la position exacte de ces sites de phosphorylation (109). Il apparaît que la liaison d'arrestine requiert un minimum de deux événements de phosphorylation à proximité (142).

Toutefois, toutes les kinases qui phosphorylent les RCPG n'ont pas le même effet fonctionnel. Par exemple, la phosphorylation du récepteur β 2AR par PKA/PKC au niveau de la boucle i3 ou par PKA au niveau de l'extrémité C-ter n'induit pas le recrutement de β -arrestine alors que la phosphorylation du C-ter de β 2AR par GRK2 augmente fortement son affinité pour le récepteur (132). En revanche, les phosphorylations par PKA/PKC et par GRK conduisent toutes deux à la désensibilisation du récepteur, mais à l'aide de mécanismes distincts (143, 144).

2.4.2. Désensibilisation indépendante de la phosphorylation

La capacité des GRK à réguler l'activation des protéines G par les RCPG n'est pas toujours dépendante de la phosphorylation du récepteur. Les GRK sont composées d'un domaine régulateur de la signalisation des protéines G (RH) en N-ter, d'un domaine protéine kinase au centre, et d'un domaine de liaison aux $G\beta\gamma$ (PH) à l'extrémité C-ter (145). L'atténuation de l'activité des protéines G par GRK2 et GRK3, de manière phospho-indépendante, a été rapportée pour des récepteurs couplés G_s (ex. récepteur à l'hormone folliculo-stimulante (146)), G_i (ex. récepteur sérotoninergique $5HT_{1B}$ (147)), et G_q (ex. récepteur à l'hormone parathyroïdienne (148)). Dans le cas des récepteurs couplés G_q , GRK2 sert de protéine d'échafaudage avec son domaine RH qui interagit avec la sous-unité $G\alpha_q$ et son domaine PH avec les sous-unités $G\beta\gamma$. L'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$ subit alors un changement de conformation qui entraîne son découplage du RCPG (149, 150). Pour les récepteurs couplés à d'autres protéines G, le mécanisme reste encore incertain puisque le domaine RH de GRK2 ne semble pas interagir avec les sous-unités $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$ (151). Peu d'informations sur le rôle potentiel des sous-types GRK4-6 dans la désensibilisation phospho-indépendante des RCPG sont disponibles à ce jour. Seule une étude montre GRK4 comme régulateur de la désensibilisation du $GABA_B$, et cela indépendamment de son activité kinase (152). Dans le cas de la désensibilisation indépendante de la phosphorylation, l'interaction de GRK avec le récepteur aurait pour rôle la régulation de la signalisation des protéines G alors que son activité kinase permettrait le recrutement d'arrestine.

En plus des GRK, d'autres protéines peuvent jouer un rôle dans la désensibilisation des RCPG : la famille RGS. Cette famille se compose de 25 membres qui agissent comme des protéines activatrices des GTPases (GAP) avec pour substrat les protéines $G\alpha$ (153, 154).

2.5. Endocytose des RCPG

2.5.1. Endocytose induite par le ligand et endocytose constitutive

La liaison des arrestines aux récepteurs sous leur forme active phosphorylée a été mise en évidence il y a plus de 30 ans (155), et son rôle dans le découplage du récepteur et des protéines G est rapidement démontré suite à cette découverte (77). Dix ans plus tard, les premiers interacteurs, autres que les RCPG, sont découverts et il s'agit de molécules impliquées dans le trafic vésiculaire : la clathrine (156) et la protéine adaptatrice AP-2 (157). Ces données sont les premières à montrer un rôle direct des arrestines, non seulement dans l'arrêt de la signalisation par les protéines G, mais aussi dans l'endocytose des récepteurs activés.

Comme discuté dans la section 2.4.1, le couplage d'arrestine au récepteur activé induit la libération de la queue C-ter d'arrestine contenant les motifs de liaisons pour AP-2 et clathrine (102, 103). Cette région contient aussi plusieurs résidus chargés positivement qui forment un site de haute affinité pour la liaison aux phosphoinositides (158). L'ensemble de ces interactions entraîne le complexe vers les puits recouverts de clathrine. Ces puits s'invaginent progressivement jusqu'à la libération de la vésicule dans le cytosol. La scission de la vésicule est effectuée par la dynamine qui s'enroule autour du col vésiculaire et ferme celui-ci par contraction, en utilisant l'hydrolyse du GTP comme source d'énergie. Une fois libérées dans le cytosol, les vésicules sont déshabillées pour que leur membrane puisse interagir avec les protéines motrices du cytosquelette et fusionner avec les endosomes précoces (159).

Malgré le fait que l'endocytose des RCPG soit considérée majoritairement comme un phénomène dépendant de l'activation par l'agoniste, plusieurs RCPG internalisent aussi de manière constitutive (160). Dans la plupart des cas, la demi-vie des récepteurs à la surface de la cellule, en l'absence d'agoniste, est plus longue qu'après stimulation, donc le taux d'internalisation est plus faible. Les mécanismes d'internalisation utilisés par un même récepteur en présence et en absence de ligand peuvent varier, par exemple, les récepteurs $\beta 2AR$ et $M3R$ internalisent de manière clathrine-dépendante lors de la stimulation par leurs agonistes respectifs, alors qu'ils utilisent un mécanisme indépendant de la clathrine lors de leur internalisation constitutive (160). Autre exemple, le récepteur $GABA_B$ qui internalise

uniquement de manière constitutive, et non en réponse à l'agoniste, avec une perte de 40% à 50% des récepteurs de surface en deux heures (161).

Le rôle de cette internalisation constitutive n'est pas encore très bien compris. Toutefois, elle a un impact certain sur la capacité de réponse de la cellule à la stimulation par un agoniste. Il a été suggéré que ce mécanisme pourrait permettre le maintien de l'homéostasie des RCPG, le contrôle de la distribution membranaire des récepteurs (162) ou encore la création d'une réserve intracellulaire de récepteurs disponibles pour remplacer ceux qui sont désensibilisés après stimulation par l'agoniste. La dérégulation de cette internalisation constitutive peut avoir des conséquences physiologiques importantes. Par exemple, La mutation R137H sur le motif DRY du récepteur V2R, entraîne une augmentation significative du recrutement d'arrestine et de son internalisation constitutive, causant une perte de fonction du récepteur qui a été reliée au développement du diabète néphrogénique insipide (163).

2.5.2. Endocytose β -arrestine- et clathrine-dépendante

Deux grands mécanismes d'endocytose s'offrent aux cargos membranaires, soit dépendant ou indépendant de la clathrine. Le modèle canonique d'internalisation des RCPG repose sur une internalisation dépendante de β -arrestine, clathrine et AP-2.

Classification des récepteurs selon leur interaction avec les arrestines

Les différences d'affinité pour β -arrestine-1 et β -arrestine-2 observées parmi les RCPG conduisent à leur séparation en deux groupes distincts. Les récepteurs de classe A présentent une plus grande affinité pour β -arrestine-2 que pour β -arrestine-1 alors que les récepteurs de classe B ont une affinité similaire pour ces deux sous-types d'arrestines (136). Dans les deux cas, les β -arrestines participent à la désensibilisation et à l'endocytose en s'associant aux RCPG. Toutefois pour les récepteurs de classe A, cette interaction est labile et le complexe arrestine/récepteur se dissocie très rapidement après internalisation (136). Au contraire, les récepteurs de classe B forment un complexe stable qui est maintenu au niveau des endosomes (136). Cette stabilité du complexe semble être déterminante dans le devenir du récepteur après internalisation puisque les récepteurs classe A sont rapidement recyclés à la membrane

plasmique après dissociation d'avec β -arrestine, alors que les récepteurs de classe B sont plutôt dirigés vers les voies de dégradation lysosomale. Les déterminants moléculaires responsables de cette affinité plus importante des récepteurs de classe B pour arrestine seront discutés ultérieurement (voir section 2.5.1)

Parmi les récepteurs prototypiques de la classe A se retrouvent : le récepteur β 2AR, μ OR ou encore dopaminergique $D1_A$ R; et de classe B : le récepteur à l'angiotensine AT1R ou encore le récepteur V2R. L'extrémité C-ter du récepteur semble jouer un rôle prépondérant dans la détermination du profil d'interaction du récepteur avec β -arrestine. Ainsi, le récepteur chimérique β 2V2R⁴ se comporte comme un récepteur de classe B (136).

Toutefois, cette classification doit être considérée avec précaution puisqu'au cours des années, il a été montré que certains récepteurs de classe A ne recyclent que très peu, et inversement pour des récepteurs de classe B. Ces profils peuvent aussi varier selon le ligand ou selon la GRK qui phosphoryle le récepteur.

Déterminants moléculaires de l'interaction AP-2/arrestine

AP-2 est une protéine hétérotrimérique composée de deux grosses sous-unités, appelées adaptines : α et β 2 (environ 100kDa), et de deux plus petites μ 2 et σ 2 (respectivement 50kDa et 17kDa). AP-2 joue le rôle de protéine adaptatrice en se liant à la clathrine afin de permettre le transport des molécules cargos (ici les RCPG) vers les puits recouverts de clathrine. Les domaines α -adaptine et β 2-adaptine sont composés de trois parties : l'oreille, le domaine charnière et le tronc [Figure 10]. Les oreilles possèdent plusieurs motifs de liaison qui permettent l'interaction avec les cargos, la clathrine, ainsi que les protéines accessoires. Ces protéines accessoires, telles que l'epsine, Eps15, CALM, l'amphiphysine et la synaptojanine, induisent la courbure de la membrane et régulent l'assemblage, la maturation, la fission et le désassemblage des vésicules recouvertes de clathrine (159).

⁴ Récepteur β 2AR dans lequel la queue C-ter a été tronquée et remplacée par celle du V2R

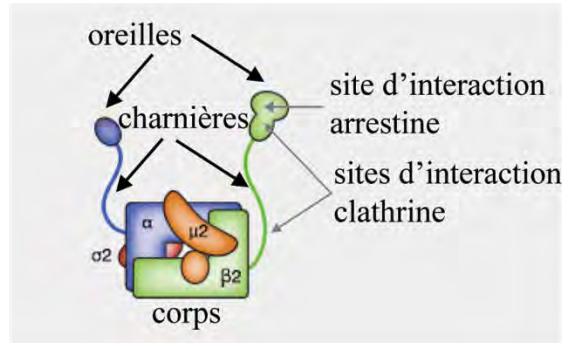


Figure 10. Représentation schématique d'AP-2

Adaptée de (164).

Des études menées par le Dr. Caron ont permis l'identification de la région d'interaction d'arrestine avec AP-2 qui se situe au niveau de l'oreille de la sous-unité β 2-adaptine (157, 165). En ce qui concerne arrestine, la délétion des 25 derniers acides aminés de sa queue C-ter conduit à une perte totale de l'interaction avec AP-2. En particulier, l'importance des résidus Arg394 et Arg396⁵ a été mise en évidence par mutagenèse. Des expériences de microscopie par fluorescence montrent aussi que le complexe β 2AR/ β -arrestine-2-R396A n'est pas transféré vers les puits recouverts de clathrine après stimulation du récepteur, contrairement au complexe β 2AR/ β -arrestine-2 sauvage (wt), mettant en évidence l'importance de cette interaction dans les étapes initiales de l'internalisation. Par ailleurs, les mutants F391E et R395E de β -arrestine-1 bloquent l'internalisation du récepteur β 2AR et agissent comme dominants négatifs (166). D'autres études de mutagenèse révèlent aussi l'implication des résidus Arg834, Trp841, Glu849, Tyr888 et Glu902 de l'oreille de β 2-adaptine dans l'interaction avec arrestine (166).

Par la suite, l'obtention du cristal de l'oreille de β 2-adaptine montre son organisation en deux sous-domaines : un β -sandwich contenant un site de liaison latéral et une plateforme avec un site de liaison supérieur. L'utilisation d'un peptide de la queue C-ter de β -arrestine-1, contenant un des motifs consensus de liaison à AP-2 (D/ExxFxx[F/L]xxxR), montre sa fixation au niveau du site supérieur de β 2-adaptine (164). Plus exactement, le peptide se glisse entre l'hélice α 1 et le feuillet β -antiparallèle de la plateforme. Le motif D₃xxF₆xxF₉xxxR₁₃ se retrouve alors orienté sur le côté de l'hélice formée par le peptide et interagit avec les résidus de la poche de liaison. La partie supérieure de cette poche est globalement chargée positivement et on y retrouve D₃ qui interagit avec Arg834 and Arg879. F₆ et F₉ sont dans un environnement hydrophobe et apolaire créée par Phe837/Leu838/Ile876 et Trp841/Tyr888 respectivement. Enfin, R₁₃ forme des liaisons avec les résidus Glu849 et Glu902 chargés négativement [Figure 11].

Il est intéressant de noter que la région de β -arrestine-1 correspondant au peptide utilisé dans cette étude forme habituellement un feuillet β , mais que le peptide adopte une conformation en

⁵ Numérotation selon la séquence de β -arrestine-2 (Arg393 et Arg395 de β -arrestine-1)

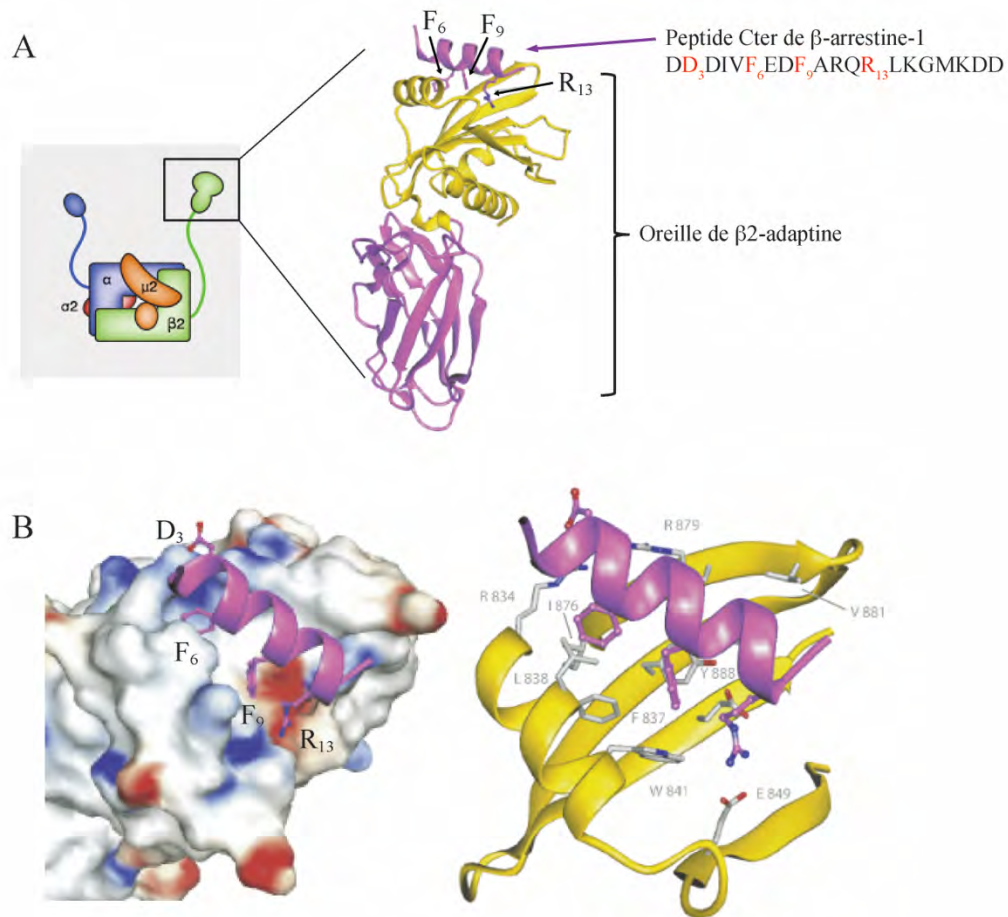


Figure 11. Structure du complexe $\beta 2$ -adaptine/ β -arrestine-1

A. Structure cristallographique du complexe $\beta 2$ -adaptine/ β -arrestine-1 comprenant l'oreille de la sous-unité $\beta 2$ -adaptine d'AP-2 et le peptide de l'extrémité C-ter de β -arrestine-1.

B. Le peptide se lie au niveau d'une poche sur $\beta 2$ -adaptine et tous les résidus du C-ter de β -arrestine-1 qui interagissent avec $\beta 2$ -adaptine sont localisés du même côté de l'hélice. Les régions chargées positivement sont représentées *en bleu* et les régions chargées négativement *en rouge*. Adaptée de (164).

hélice α lorsque liée à β 2-adaptine. Cela suggère un changement de la conformation d'arrestine induit par son interaction avec AP-2, toutefois cette hypothèse ne pourra être confirmée que par l'obtention de la structure du complexe récepteur/arrestine/AP-2.

Déterminants moléculaires de l'interaction clathrine/arrestine

La région C-ter d'arrestine interagit aussi avec la clathrine, qui est composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Trois molécules de clathrine s'assemblent pour former une structure caractéristique en forme de trisquèle qui se retrouve au niveau des puits recouverts de clathrine [Figure 12]. Les RCPG ne lient pas directement la clathrine, arrestine sert donc de protéine d'échafaudage pour permettre la formation de ce complexe. β -arrestine-1 et β -arrestine-2 se lient toutes deux à la clathrine avec un Kd de 64nM et 10nM respectivement (156), ce qui est comparable au Kd de 10nM observé pour la liaison AP-2/clathrine (167).

Les arrestines contiennent une séquence consensus de liaison à la clathrine au niveau de leur extrémité C-ter : $L\Phi x\Phi[D/E]$, où Φ est un résidu hydrophobique encombrant (Leu, Iso, Met, Phe ou Val). Cette séquence se retrouve aussi parmi plusieurs autres interacteurs de la clathrine tels que AP-2, epsine ou amphiphysine. Il a été montré que la délétion ou la mutation de ce motif dans β -arrestine-1 était suffisante pour perturber son interaction avec la clathrine, et en conséquence l'internalisation du récepteur (166, 169, 170).

Les structures cristallographiques des β -arrestines en complexe avec clathrine ont été résolues (chaîne lourde de la clathrine en complexe avec un peptide de β -arrestine-2 (171) ou avec β -arrestine-1 pleine longueur (94)). Elles ont permis de démontrer l'interaction entre le motif $L\Phi x\Phi[D/E]$ d'arrestine et un bandeau de résidus hydrophobes et basiques sur l'extrémité N-ter de la chaîne lourde de clathrine, complétant les résidus hydrophobiques et acides du motif $L\Phi x\Phi[D/E]$. En particulier, les résidus Glu89, Lys96 et Lys98 sont essentiels à cette interaction [Figure 13] (172).

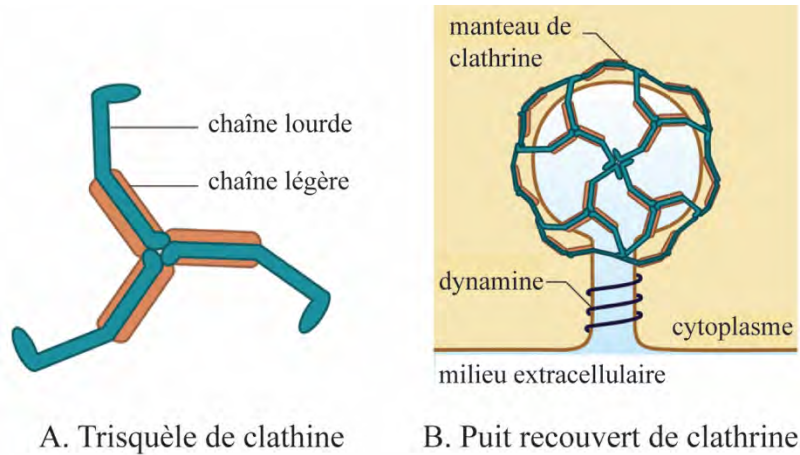


Figure 12. Structure schématique de la clathrine et d'un puit recouvert de clathrine
Adaptée de (168).

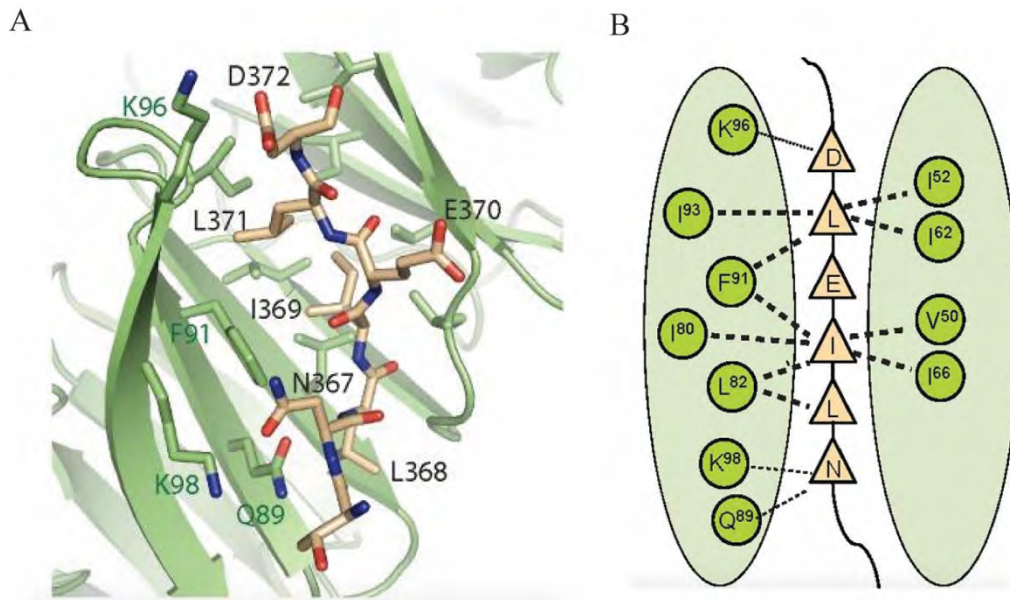


Figure 13. Structure du complexe clathrine/β-arrestine-1

A. Interface d'interaction entre β-arrestine-1 et clathrine. Les résidus du motif $L\Phi x\Phi[D/E]$ et les résidus clés de β-arrestine-1 dans la poche hydrophobique de la clathrine sont numérotés en *noir* et *vert* respectivement.

B. Carte unidimensionnelle de la surface d'interaction. Les liaisons hydrogènes potentielles sont en *pointillés* et les interactions hydrophobiques en *pointillés gras*. Adaptée de (94).

Déterminants moléculaires de l'interaction phosphoinositide/arrestine

Les phosphoinositides sont des phospholipides impliqués dans la régulation de la signalisation cellulaire et du trafic membranaire. En particulier, PIP₂ est enrichi au niveau de la membrane plasmique (173) et joue un rôle lors de l'internalisation des RCPG. β -arrestine-1 et β -arrestine-2 présentent un site de liaison de haute affinité avec PIP₂ au niveau de leur extrémité C-ter composé de trois résidus basiques: Lys233, Arg237 et Lys251⁶. Le mutant β -arrestine-2-KRK/Q bloque le recrutement du récepteur β 2AR aux puits recouverts de clathrine, sans toutefois affecter le recrutement de β -arrestine-2 au récepteur ou sa capacité à lier la clathrine (174).

Une fois recrutée au récepteur activé, β -arrestine active la production de PIP₂ en activant l'enzyme PIP5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) conduisant à une augmentation de la concentration locale en PIP₂ qui favorise l'internalisation du récepteur (175).

2.5.3. Endocytose β -arrestine-indépendante et clathrine-dépendante

Dans la plupart des cas, les RCPG utilisent la β -arrestine comme protéine d'échafaudage pour permettre la liaison du récepteur avec la machinerie d'endocytose. Toutefois, l'internalisation par la voie des clathrines peut présenter des divergences puisque dans certains cas elle se fait de manière indépendante des β -arrestines. Les premières évidences démontrant ce type d'internalisation sont obtenues à l'aide de mutants dominants négatifs d'arrestine qui ne bloquent pas l'internalisation de certains RCPG (176-179), puis à l'aide de fibroblastes embryonnaires (MEF) obtenus à partir de souris KO pour β -arrestine-1 et β -arrestine-2 (180-182). Font partie de cette catégorie : le récepteur activé par la protéase de type 1 (PAR1), le récepteur à la sérotonine de type 2A (5-HT_{2A}) (183), le récepteur à la prostaglandine (FP) (184), le récepteur à la prostacycline (IP) (179), le récepteur au peptide formyle (FPR) (181), le récepteur muscarinique de l'acétylcholine de type 2 (m2 mAChR) (177), le récepteur à la sécrétine (SR) (185) et le récepteur au leukotriène (BLT1) (186). Notons que parfois, ces

⁶ Numérotation selon la séquence de β -arrestine-2

mécanismes d'internalisation non-dépendants de β -arrestine sont limités à des conditions physiologiques particulières comme dans le cas du récepteur métabotrope au glutamate de type 1 (mGlu1R) qui n'utilise cette voie que lors d'une internalisation en l'absence d'agoniste (187).

Interaction directe des RCPG avec AP-2

AP-2 est capable de se lier directement au motif tyrosine d'endocytose $Y_{xx}\Phi^7$ présent sur la face cytoplasmique de plusieurs protéines membranaires, dont la queue C-ter de quelques RCPG (188). La liaison d'AP-2 se fait alors en deux étapes : premièrement, la sous-unité α se lie avec une faible affinité aux phosphoinositides PIP_2 de la membrane plasmique (189), puis la kinase AAK1 (adaptor-associated kinase) phosphoryle la sous-unité $\mu 2$ -adaptine d'AP-2 augmentant l'affinité de cette dernière pour le motif d'endocytose, ce qui permet la formation d'un complexe avec la protéine cargo (190).

Le récepteur PAR1 utilise ce motif d'endocytose lors de son internalisation constitutive. Les travaux de JoAnn Trejo soulignent l'importance de ce mécanisme dans le maintien d'une réserve intracellulaire du récepteur, qui permet un rétablissement de la réponse cellulaire suite à l'activation par protéolyse du récepteur plus rapide que via une synthèse de récepteurs *de novo*. Les résultats de son équipe montrent que l'utilisation d'un mutant PAR1 incapable d'interagir avec AP-2, ou la baisse de l'expression d'AP-2 par ARN interférent, conduit à une diminution drastique de l'internalisation constitutive du récepteur et une absence de resensibilisation des cellules après stimulation par le ligand (180). Il est intéressant de noter que l'internalisation de PAR1 suite à son activation par l'agoniste, quoique toujours dépendante de la clathrine, ne requiert ni AP-2 ni β -arrestine (191), ce qui montre là encore la capacité des RCPG à engager différentes voies d'endocytose selon les conditions physiologiques.

Le récepteur à la thromboxane $TP\beta$ possède un motif similaire $Y_{xxx}\Phi$ au niveau de sa queue C-ter et internalise de manière β -arrestine indépendante, mais le rôle d'AP-2 n'a pas été testé

⁷ Φ est un résidu hydrophobique encombrant

(192). L'interaction directe de la sous-unité $\mu 2$ -adaptine d'AP-2 avec l'extrémité C-ter du récepteur adrénergique α_{1b} AR est aussi importante dans l'internalisation, toutefois elle n'implique pas de motif consensus tyrosine mais plutôt un segment de huit arginines (180, 193).

D'autres récepteurs membranaires, non RCPG, possèdent aussi ce motif d'interaction avec AP-2, c'est le cas du récepteur à la transferrine TfR qui régule l'import de fer à l'intérieur de la cellule (180).

Un motif dileucine [DE]xxxL[LI] est aussi reconnu par les sous-unités α , $\sigma 2$ et possiblement $\beta 2$ d'AP-2 (194). Ce motif est présent dans plusieurs RCPG dont les récepteurs aux chimiokines CXCR2 et CXCR4 ainsi que $\beta 2$ AR, et joue un rôle dans leur internalisation. Toutefois, il n'y a pas d'évidence que la liaison d'AP-2 au récepteur via ce motif soit suffisante pour permettre une internalisation indépendante de β -arrestine (194).

2.5.4. Endocytose β -arrestine-indépendante et clathrine-indépendante

L'internalisation peut se faire via des voies indépendantes de la clathrine : les cavéoles. Ces structures correspondent à des invaginations de la membrane plasmique (ou radeaux lipidiques) formées par les protéines cavéolines et cavins, et enrichies en glycosphingolipides et cholestérol (195). La scission de ces vésicules est dépendante de la dynamine. Dans le cas du récepteur à l'endothéline de type A (ET_A R) par exemple, l'endocytose peut être clathrine-dépendante, après phosphorylation du récepteur par GRK2 (196), ou bien cavéoles-dépendante (197). Une étude suggère aussi que l'oxydation du cholestérol membranaire pourrait contrôler le passage d'un mécanisme d'endocytose à l'autre (198). Plusieurs autres RCPG, comme $\beta 2$ AR (199), AT1R (200, 201), M2R (202, 203) et le récepteur à la dopamine D1R (204) peuvent aussi utiliser la voie des cavéoles et, dans la plupart des cas, les mécanismes gouvernant la sélection de la voie d'endocytose ne sont pas connus.

2.6. Trafic intracellulaire des RCPG

Une fois formées, les vésicules endocytiques sont déshabillées puis rapidement acheminées vers des organites spécialisés, appelés endosomes précoces, avec lesquels elles

fusionnent pour relarguer leur contenu. Les endosomes précoces représentent la porte d'entrée d'un réseau endocytaire composé de différents compartiments membranaires qui permettent l'acheminement des protéines cargo soit vers les voies de dégradation lysosomales, soit vers les voies de recyclage. Une fois dans les endosomes précoces, les RCPG peuvent être déphosphorylés puis recyclés au niveau de la membrane plasmique, où ils seront à nouveau disponibles pour une activation par l'agoniste : c'est la resensibilisation (205). Alternativement, ils peuvent être adressés vers des voies de dégradation, ce qui conduit alors à une diminution de la quantité du récepteur en question dans la cellule et une régulation négative à long terme de son activité (205).

Les vitesses d'internalisation, de recyclage ou de dégradation des RCPG varient d'un récepteur à l'autre ce qui laisse supposer l'existence de mécanismes de régulation distincts. Dans cette section, nous discuterons des connaissances actuelles concernant ces mécanismes de tri endosomal des RCPG.

2.6.1. Phosphorylation des RCPG et interaction avec arrestine

Les RCPG sont phosphorylés majoritairement sur les résidus Ser et Thr situés au niveau de leur boucle i3 et de leur extrémité C-ter. Cette phosphorylation favorise le recrutement des arrestines au récepteur, mais joue aussi un rôle dans la stabilité du complexe récepteur/arrestine et le devenir du récepteur suite à son internalisation. Les RCPG de classe B (section 2.5.2) sont phosphorylés au niveau de plusieurs résidus Ser/Thr regroupés à l'extrémité de leur queue C-ter. Or, l'interaction d'arrestine avec le récepteur est médiée par une somme d'interactions de faible affinité à la fois au niveau de son senseur d'activation et de son senseur de phosphorylation. Ainsi, la multiplication des interactions élémentaires, comme dans le cas d'un récepteur présentant plusieurs phosphates, permet la formation d'un complexe plus affiné et donc plus stable (109, 136).

Les conséquences physiologiques de cette association prolongée avec arrestine sont variées. La plupart des récepteurs de classe B maintiennent leur interaction avec arrestine et sont adressés vers la voie de dégradation lysosomale après endocytose. Dans ce cas, le maintien du complexe arrestine/récepteur permet une activation plus soutenue des complexes protéiques activés par le

biais d'arrestine. Ces voies de signalisation arrestine-dépendantes seront développées ultérieurement (voir chapitre 3). Le récepteur V2R appartient à la classe B mais recycle lentement à la membrane après stimulation par son ligand. La stabilité du complexe V2R/arrestine au niveau des endosomes prévient le recrutement des phosphatases au récepteur, et le ralentissement de sa déphosphorylation inhibe le processus de recyclage du V2R (206). Pour preuve, les mutants non-phosphorylables du récepteur V2R au niveau des résidus Ser de l'extrémité de sa queue C-ter (S362A, S363A, ou S364A) présentent une meilleure efficacité de recyclage, sans que leur internalisation ne soit affectée (207). Dans le cas du FPR, le recrutement des arrestines n'est pas nécessaire à son internalisation, mais il semble essentiel à son recyclage (181).

2.6.2. Endosome précoce : centre de triage des protéines cargo

Les différentes voies d'internalisation des protéines cargo, et donc des RCPG, convergent vers les endosomes précoces. Ces endosomes constituent une station de tri où sont séparées les protéines destinées à être recyclées, de celles qui seront dégradées. Les endosomes précoces sont des compartiments pléomorphiques composés de régions tubulaires et de vésicules. Ces sous-domaines ont une importance fonctionnelle puisque les protéines destinées au recyclage se regroupent plutôt dans les régions tubulaires, alors que les zones vésiculaires contiennent majoritairement des protéines qui seront adressées aux voies de dégradation (208). À cause du pH légèrement acide de la lumière des endosomes précoces (pH = 6,3-6,8), la plupart des RCPG se dissocient de leurs ligands.

Les protéines de la famille Rab (Ras-associated binding protein) sont associées aux différents compartiments membranaires du réseau endocytique. Ces Rab sont des petites GTPases qui recrutent de nombreux effecteurs permettant à la fois leur régulation et le déclenchement d'évènements de signalisation. Les protéines Rab4 et Rab5 sont spécifiquement localisées au niveau des endosomes précoces et participent réciproquement aux réactions de fusion des membranes des endosomes précoces (209) et à la formation des vésicules de recyclage (210). D'autres Rab : Rab10 (211), Rab14 (212), Rab21 (213), Rab22 (214), sont associées aux endosomes précoces mais leurs rôles sont moins clairement établis. Rab11 se retrouve au niveau des endosomes de recyclage et Rab7 au niveau des endosomes

tardifs/lysosomes (215). Dans de nombreuses études, les protéines Rab sont utilisées afin de permettre de suivre le trafic endocytaire des RCPG, par exemple via des expériences de co-localisation en microscopie, ou plus récemment, en permettant la mise au point de biosenseurs basés sur la technique de transfert d'énergie de bioluminescence (BRET) (216).

Les mécanismes qui contrôlent l'adressage d'un RCPG vers les voies de recyclage ou de dégradation sont encore mal compris. Toutefois, le rôle de certains complexes protéiques dans le tri moléculaire des cargos a pu être mis à jour (217). Trois complexes majeurs ont été identifiés à ce jour: ESCRT (endosome sorting complex required for transport, (218)) et GASP (GPCR-associated sorting proteins, (219)) sont associés aux voies de dégradation lysosomale des récepteurs, alors que ASRT (actin/sorting nexin/ 27-retromer tubule, (220)) permet le recyclage vers la membrane plasmique.

2.6.3. Adressage des RCPG vers les voies de dégradation

Ubiquitination du RCPG et prise en charge par la machinerie ESCRT

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en la liaison covalente d'une molécule d'ubiquitine sur un résidu Lys accepteur du substrat. Cette réaction est effectuée par les ubiquitine-ligases. L'ubiquitination des RCPG est régulée par l'agoniste ou non. Cependant, l'ubiquitination indépendante du ligand semble être impliquée plutôt dans le contrôle qualité du récepteur après synthèse protéique, son export à la membrane ou sa dégradation par le protéasome, que dans son trafic post-endocytaire (221, 222) [Figure 14]. Les résidus Lys de n'importe quel domaine cytoplasmique des RCPG peuvent être ubiquitinés. Par exemple, le récepteur μ OR est ubiquitiné principalement au niveau de deux Lys de la boucle i1, alors que les Lys de son extrémité C-ter ne sont pas modifiées (223). Dans le cas du récepteur β 2AR, ce sont les Lys situées à la fois dans la boucle i3 et dans la queue C-ter qui sont ubiquitinées (224). Enfin, pour les récepteurs CXCR4 et PAR1, seulement les Lys C-ter sont ubiquitinées mais pas les lysines des boucles intracellulaires (225, 226).

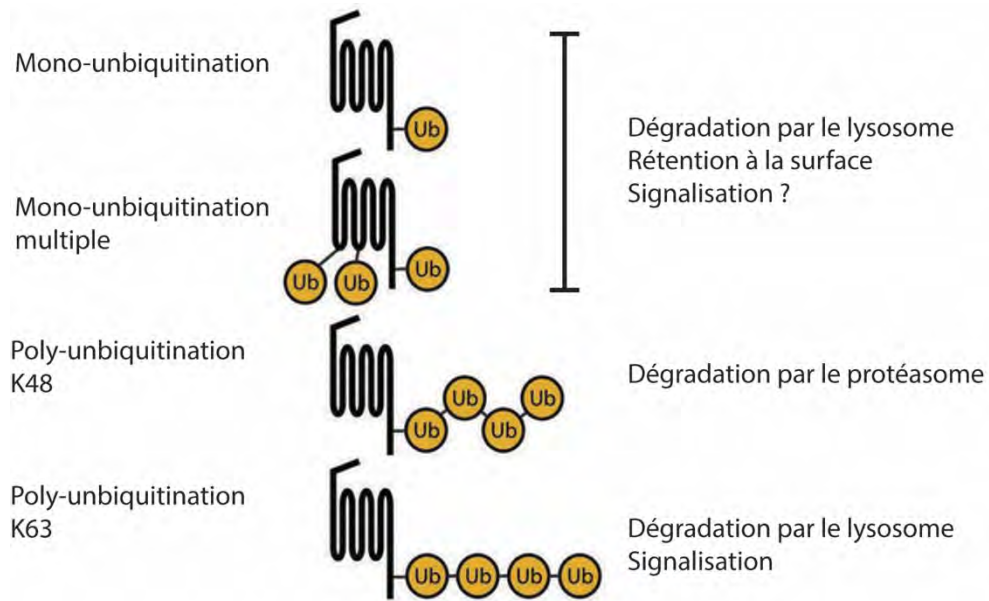


Figure 14. Différents types d'ubiquitination des RCPG

Adaptée de (227).

Les RCPG sont potentiellement modifiés par différents types de conjugaison avec l'ubiquitine incluant : mono-ubiquitination, mono-ubiquitination multiple, poly-ubiquitination via la Lys48 ou via la Lys63. Ces différents types d'ubiquitination régulent différentes fonctions cellulaires : la dégradation par le protéasome et par le lysosome, la rétention à la surface de la cellule et la signalisation.

L'importance de l'ubiquitination dans le trafic post-endocytaire des RCPG a été mise en évidence pour la première fois dans les levures où l'ubiquitination des récepteurs Ste2 et Ste3 entraînent leur adressage vers les vacuoles/lysosomes (228, 229). Le complexe ESCRT est impliqué dans cette fonction et reconnaît spécifiquement les protéines cargo ubiquitinées pour les diriger vers la voie de dégradation lysosomale. Ce complexe est fortement conservé au sein du règne eucaryote et se retrouve chez les levures, les protistes, les plantes et les cellules animales. Le complexe ESCRT-0 initie le processus de tri des protéines cargo (230). Un des composants majeurs de ce complexe, la protéine Hrs (hepatocyte-growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) est recrutée aux endosomes précoces via son domaine à doigts de zinc, FYVE. FYVE permet à Hrs de se lier à PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Hrs possède un domaine d'interaction avec l'ubiquitine et avec la protéine Tsg101 du complexe ESCRT-I, localisé aux endosomes tardifs (ou corps multi-vésiculaires). Ces interactions permettent l'acheminement des protéines ubiquitinées vers la voie de dégradation lysosomale. Les complexes ESCRT-II et ESCRT-III sont ensuite recrutés de manière séquentielle et permettent la maturation des corps multi-vésiculaires et leur fusion avec les lysosomes (231) [Figure 15].

C'est pour le récepteur CXCR4 que le mécanisme d'adressage vers les lysosomes a été le mieux caractérisé. Dans un premier temps, l'E3-ligase AIP4 ubiquitine CXCR4 au niveau des lysines du motif de dégradation SSLKILSKGK, situé à l'extrémité de sa queue C-ter (225). Il est intéressant de noter que la mutation des résidus Ser en Ala au niveau de ce motif réduit l'ubiquitination du récepteur, suggérant un rôle potentiateur de la phosphorylation. Après internalisation, CXCR4, AIP4 et Hrs, colocalisent dans des sous-domaines vésiculaires au niveau des endosomes précoces (232). AIP4 ubiquitine alors Hrs, ce qui joue un rôle régulateur dans la prise en charge de CXCR4 par le complexe ESCRT-0. AIP4 est régulée négativement par la Ser/Thr kinase CISK, elle-même activée en aval de PI3K (233). Après ubiquitination, CXCR4 migre vers les endosomes tardifs. Finalement, l'activité AAA-ATPase de la protéine Vsp4 conduit au désassemblage du complexe ESCRT-III, étape nécessaire à la fusion des corps multi-vésiculaires avec les lysosomes et à la dégradation efficace du récepteur CXCR4 (234).

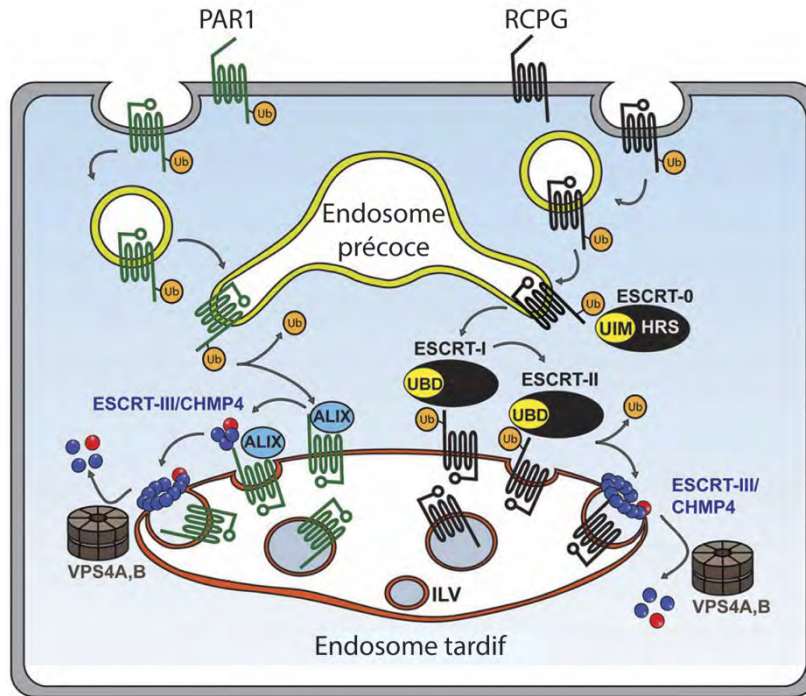


Figure 15. Dégradation lysosomale des RCPG

Le paradigme de la dégradation lysosomale des RCPG fait intervenir l'ubiquitination et l'internalisation post-stimulation des récepteurs. Le récepteur ubiquitiné est ensuite reconnu par le complexe ESCRT-0/Hrs qui porte un motif de reconnaissance de l'ubiquitine (UIM) puis ESCRT-I et ESCRT-II qui contiennent des motifs de liaison à l'ubiquitine (UBD). Les RCPG sont déubiquitinés avant d'être dirigés vers les endosomes tardifs. Ce processus est contrôlé par les protéines CHMP4 et Vsp4 du complexe ESCRT-III. Le récepteur PAR1 est dirigé vers le protéasome de manière indépendante de l'ubiquitine. La protéine ALIX lie le motif de dégradation YPxxxL du récepteur PAR1 et permet l'interaction du récepteur avec le motif ESCRT-III et sa dégradation lysosomale. PAR1 est ubiquitiné mais cette ubiquitination n'est pas essentielle à sa dégradation. Adaptée de (227).

Rôle d'arrestine dans l'ubiquitination des RCPG

Le groupe de Robert Lefkowitz fut le premier à démontrer le lien entre l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation. Shenoy et ses collègues montrent que la mutation de l'ensemble des résidus Lys du récepteur β 2AR en Arg n'impacte pas l'internalisation du récepteur mais bloque sa régulation négative par dégradation (235). Dans cette étude, les auteurs montrent aussi que la stimulation du récepteur β 2AR conduit à la fois à son ubiquitination et à celle de β -arrestine. De plus, l'ubiquitination du récepteur requiert le recrutement d'arrestine puisqu'elle est perdue dans les MEF KO β -arrestine-1/2. Elle est restaurée par l'expression exogène de β -arrestine-2 seulement, et pas β -arrestine-1, soulignant le rôle spécifique de cet isoforme. De manière intéressante, l'ubiquitination de β -arrestine-2 par Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) est requise pour l'internalisation du récepteur mais pas pour sa dégradation, et Mdm2 n'est pas responsable de l'ubiquitination de β 2AR. Quelques années plus tard, ils identifient la protéine NEDD4 comme étant responsable de l'ubiquitination du récepteur β 2AR et confirment le rôle de β -arrestine-2 comme protéine adaptatrice permettant son recrutement au récepteur (236).

Machinerie GASP et dégradation des RCPG indépendante de l'ubiquitine

L'ubiquitination est le signal majeur pour la dégradation lysosomale des RCPG. Il a été proposé que certains récepteurs soient dégradés indépendamment de leur ubiquitination. Par exemple, la forme non-ubiquitable du récepteur δ OR, où tous les résidus Lys sont mutés en Ala, est dégradée de la même manière que la forme sauvage après stimulation par l'agoniste (237). La dégradation de δ OR fait intervenir la protéine GASP qui se lie au niveau de la queue C-ter des RCPG et permet la dégradation des récepteurs non-ubiquitinés, en facilitant leur interaction avec certains composants de la machinerie ESCRT, tels que Hrs et Vsp4. Il est suggéré dans la littérature que la protéine GASP en complexe avec le récepteur réduit sa mobilité latérale dans la membrane des endosomes précoces et inhibe ainsi sa migration vers les zones tubulaires qui présentent une durée vie assez courte, ce qui favorise un adressage vers les voies de dégradation plutôt que les voies de recyclage (238).

Il est intéressant de noter que GASP a été rapportée comme interagissant avec de nombreux RCPG (239), y compris des récepteurs dégradés via une voie dépendante de l'ubiquitination, et que le rôle de GASP dans la régulation de la dégradation des RCPG n'est certainement pas pleinement élucidé à ce jour (219, 240, 241).

2.6.4. Adressage des RCPG vers les voies de recyclage

Machinerie ASRT et recyclage des RCPG

Le recyclage des RCPG est médié par une population spécifique de microdomaines tubulaires des endosomes qui diffèrent des tubules de transport « en vrac » (ou « bulk flow »). Ces microdomaines sont caractérisés par la présence du complexe ASRT [Figure 16]. L'interaction des RCPG avec le complexe ASRT dépend de la présence d'un motif ligand PDZ C-ter de type I (x[S/T]xØ), de type II (xØxØ), ou de type III (x[D/E]xØ) (238). La baisse de l'expression d'un des trois composants du complexe ASRT ou la mutation du domaine ligand PDZ est suffisante pour inhiber le recyclage des récepteurs β 1AR, β 2AR, δ OR ou PTHR (219, 242, 243).

Le mécanisme par lequel les RCPG sont exclus des tubules de transport en vrac reste encore incertain. Les données actuelles montrent que la diffusion latérale du récepteur β 2AR au sein des endosomes est restreinte, or les tubules de transport « en vrac » présentent un taux de fission très rapide. L'actine des domaines ASRT stabilise et ralentit la fission de ces microdomaines, ce qui pourrait laisser le temps nécessaire aux récepteurs pour diffuser puis s'accumuler dans ces régions via leur interaction avec le complexe (244). Toutefois, ce modèle doit encore être validé expérimentalement.

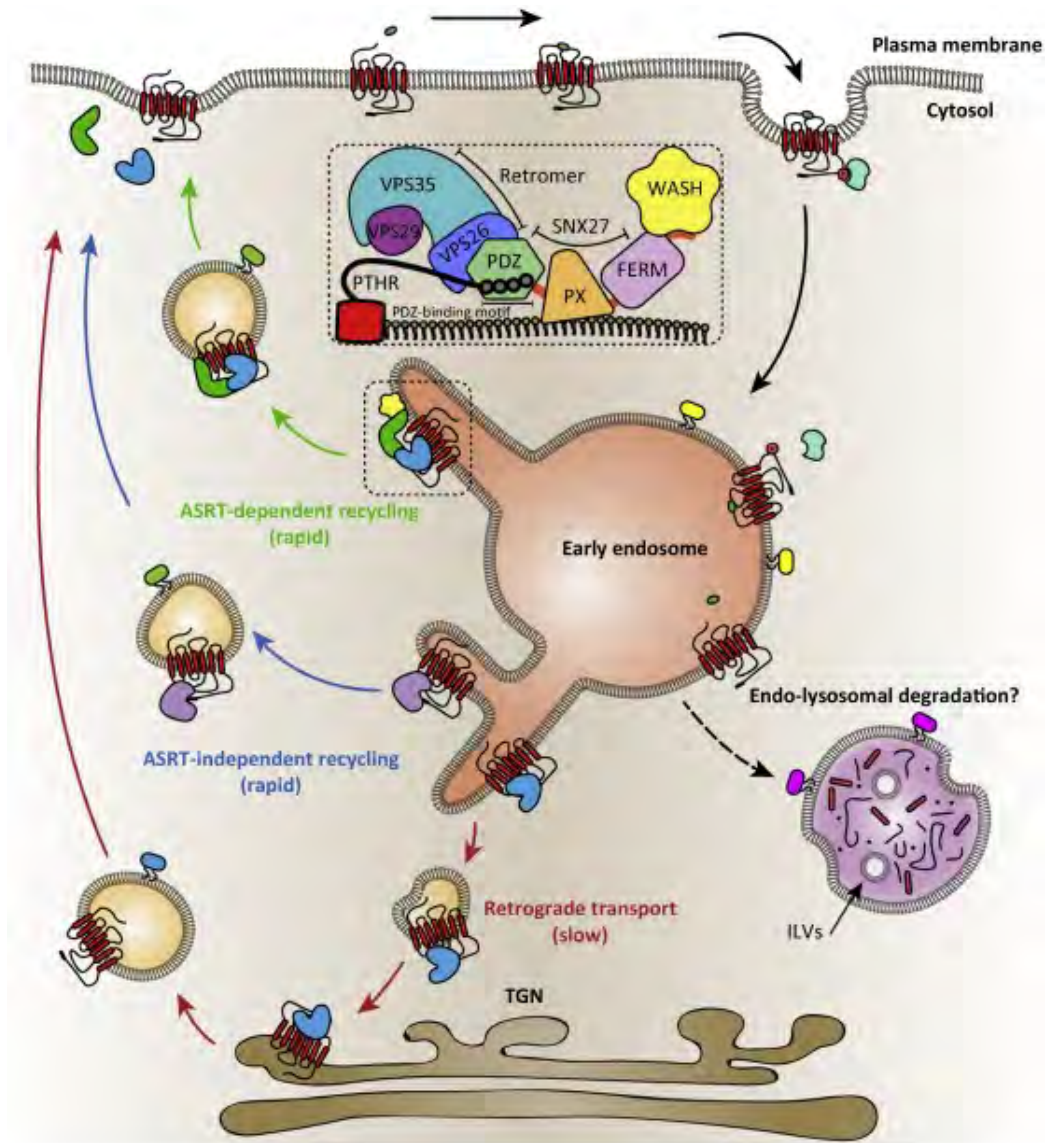


Figure 16. Recyclage des RCPG

Après internalisation, les récepteurs sont dirigés vers les endosomes précoces pour le tri endosomal. Les RCPG qui contiennent un motif de liaison PDZ sur leur C-ter sont reconnus par les protéines du complexe ASRT, telle que SNX27. Après le tri, les récepteurs sont regroupés dans les tubules de recyclage et transportés vers la membrane plasmique. Au contraire, les RCPG marqués pour la dégradation sont envoyés vers les corps multi-vésiculaires. Le récepteur à l'hormone parathyroïdienne, PTHR, peut suivre trois voies de recyclage : (1) le recyclage médié par le complexe ASRT (*en vert*), (2) le recyclage indépendant du complexe ASRT (*en bleu*), (3) le transport rétrograde vers le réseau *trans*-golgien (*en rouge*). Adaptée de (245).

2.7. Modifications post-transcriptionnelles et modulation du trafic des RCPG

Les RCPG subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles qui influencent leur prise en charge par les machineries d'internalisation et de tri post-endocytiques. Parmi ces modifications, se retrouvent principalement : la phosphorylation, l'ubiquitination, la SUMOylation et la nitrosylation.

2.7.1. Modifications post-transcriptionnelles des RCPG

Phosphorylation

La phosphorylation du récepteur est bien connue pour permettre l'engagement d'arrestines et des voies d'endocytose, comme discuté dans les sections 2.4.1 et 2.5.1. Des données dans la littérature suggèrent que cette phosphorylation joue aussi un rôle dans les événements plus tardifs du trafic intracellulaire du récepteur, soit en facilitant l'ajout de modifications post-transcriptionnelles additionnelles, soit en modulant l'interaction des récepteurs avec des protéines de tri endosomal. Par exemple, les protéines E3-ligases reconnaissent préférentiellement les substrats phosphorylés, donc la phosphorylation des RCPG participe au contrôle de leur adressage vers les lysosomes. Ainsi, la mutation de certains sites de phosphorylation potentiels sur les récepteurs Ste2 (246) ou CXCR4 (225) inhibe l'adressage de ces récepteurs vers les vacuoles/lysosomes en réduisant leur ubiquitination.

D'autre part, la déphosphorylation du récepteur est une étape critique dans le processus de recyclage et de resensibilisation (247). Les phosphatases spécifiques à certains RCPG ont été identifiées. Toutefois notre compréhension de la régulation du trafic et de la signalisation des récepteurs par ces protéines reste limitée. Les premiers travaux sur le récepteur β 2AR, ont établi un modèle selon lequel la déphosphorylation du récepteur par les phosphatases de la famille de la protéine phosphatase 2A (PP2A), essentielle à la resensibilisation, aurait lieu lors de l'internalisation du récepteur dans les endosomes (248). Toutefois, des données plus récentes démontrent une déphosphorylation des sites GRK à la membrane plasmique alors que la déphosphorylation des sites PKA nécessite l'internalisation du récepteur (249). De la même

manière, certains sites du récepteur à la somatostatine sont déphosphorylés à la membrane alors que d'autres ne le sont qu'après internalisation, ce qui suggère l'implication de différentes phosphatases (250). Hinkle et ses collègues proposent que l'internalisation du récepteur et la dissociation du ligand dans les endosomes précoces permettent un retour à l'état inactif du récepteur entraînant une diminution de son affinité pour arrestine. La dissociation du complexe arrestine/récepteur qui s'ensuit pourrait faciliter l'accès des phosphatases à certains sites phosphorylés auparavant inaccessibles (251).

Ubiquitination

L'ubiquitination est le signal majeur de dégradation des RCPG et l'ubiquitine agit comme molécule d'adressage vers le lysosome (voir section 2.6.3). Il est intéressant de noter que l'ubiquitination des récepteurs est dynamique et contrebalancée par les déubiquitinasés (DUB). Une déubiquitination dépendante de la stimulation par l'agoniste a été démontrée pour quelques RCPG. Par exemple, la diminution de l'expression des DUB USP20 et USP33 par des ARN interférents augmente l'ubiquitination et la dégradation lysosomale de β 2AR induite par le ligand (252). Ces DUB possèdent une grande sélectivité (253). Par exemple, USP4 déubiquitine α 2AR (254) et augmente son expression de surface mais n'affecte pas l'ubiquitination de β 2AR (252). Au vu de ces résultats, Berthouze et ses collègues proposent que le recyclage rapide depuis les endosomes précoces implique seulement la déphosphorylation de récepteurs non-ubiquitinés alors que le recyclage plus lent des récepteurs ubiquitinés est contrôlé conjointement par les DUB et les phosphatases. Ainsi, les DUB servent de commutateurs entre les voies de recyclage et de resensibilisation, ou les voies de dégradation et de désensibilisation à long-terme des RCPG (252).

SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-transcriptionnelle voisine de l'ubiquitination (255). L'attachement du groupe SUMO à un résidu Lys est effectué par une cascade enzymatique comprenant SUMO E1, E2 (Ubc9) et E3.

Quelques études ont montré la SUMOylation des RCPG, toutefois l'importance de cette modification post-transcriptionnelle sur la modulation du trafic des récepteurs est encore peu connue. Par exemple, le récepteur 5-HT_{1A} est SUMOylé de manière agoniste-dépendante et la forme SUMO1-5-HT_{1A} est inactive et localisée majoritairement au niveau des endosomes. Les auteurs proposent donc que la SUMOylation puisse jouer un rôle dans la désensibilisation et peut-être l'endocytose du récepteur 5-HT_{1A} (256).

Les données de la littérature rapportent la SUMOylation d'au moins deux autres RCPG : le récepteur cannabinoïde CB1 (257) et mGluR8 (258). Contrairement au récepteur 5-HT_{1A}, la stimulation de CB1 par l'agoniste semble diminuer sa SUMOylation. Pour mGluR8, comme pour CB1, la fonction physiologique de cette SUMOylation reste inconnue.

Palmitoylation

La palmitoylation consiste en l'ajout d'un acide gras, souvent l'acide palmitique, sur un résidu Cys, Ser ou Thr d'une protéine membranaire. Cette modification covalente augmente l'hydrophobicité des protéines et contribue à leur association à la membrane plasmique. Elle participe aussi à la localisation et le trafic subcellulaire des protéines (259, 260).

La palmitoylation du récepteur à la rhodopsine, puis de β2AR, ont été rapportées dès les années 80 (38, 261). Les études démontrent que la palmitoylation des RCPG au niveau de la queue cytoplasmique permet la création d'un point d'ancrage dans la membrane après la boucle i3, formant ainsi une quatrième boucle intracellulaire (27, 262).

Les travaux menés par Mark Wheatley et Michel Bouvier montrent que la palmitoylation des récepteurs joue aussi un rôle dans leur internalisation et leur signalisation. Le récepteur V1_AR est palmitoylé sur les résidus Cys371/372 en réponse à l'agoniste et cette modification diminue la phosphorylation du récepteur et augmente son internalisation (263). De la même manière, la palmitoylation de V2R sur les Cys341/342 augmente le recrutement d'arrestine au récepteur et donc son internalisation, ainsi que l'activation des voies dépendantes d'arrestine, telle que la stimulation de ERK1/2 (264). Enfin, la forme non palmitoylée du récepteur β2AR présente une activation réduite de l'adénylate cyclase (38). Tous ces résultats mettent donc en évidence le rôle de la palmitoylation dans la régulation des RCPG.

2.7.2. Modifications post-transcriptionnelles des arrestines

Les arrestines, tout comme les RCPG, subissent diverses modifications post-transcriptionnelles qui vont influencer leur interaction avec les RCPG et avec d'autres protéines accessoires. Nous nous intéresserons ici aux modifications post-transcriptionnelles qui affectent le trafic intracellulaire des récepteurs.

Phosphorylation

La phosphorylation joue un rôle majeur dans la régulation de la signalisation et du trafic intracellulaire des RCPG, et elle peut avoir lieu soit directement sur le récepteur soit sur un interacteur. Deux études publiées en 1997 (265) et 2002 (266) par l'équipe de Robert Lefkowitz montrent que les β -arrestines sont phosphorylées à l'état basal. La stimulation du récepteur β 2AR favorise leur déphosphorylation, qui touche plus particulièrement la sous-population de β -arrestines qui colocalise avec le récepteur à la membrane plasmique (265). Les sites de phosphorylation et les kinases ne sont pas conservés entre β -arrestine-1 et β -arrestine-2. β -arrestine-1 est phosphorylée sur la Ser412 par les kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) (265, 267). β -arrestine-2 est phosphorylée sur la Thr383 par la caséine kinase de type II (CKII) et sur la Ser361 par une kinase inconnue (266). En utilisant le mutant non-phosphorylable β -arrestine-1-S412A ou phosphomimétique S412D, les auteurs montrent que le recrutement d'arrestine au récepteur ainsi que la désensibilisation de ce dernier, ne sont pas dépendants du statut de phosphorylation de l'arrestine. En revanche, le mutant S412A favorise la formation du complexe arrestine/clathrine ainsi que l'internalisation du récepteur (265). Des résultats similaires ont été obtenus en mutant les sites de phosphorylation de β -arrestine-2 (266). Toutefois, une étude ultérieure, bien qu'ayant confirmé la phosphorylation de β -arrestine-2 sur la Thr383 par CKII, n'a pas confirmé l'impact de cette phosphorylation sur la formation du complexe arrestine/clathrine (268).

Une autre étude, publiée par le laboratoire de Stéphane Laporte, rapporte un nouveau mécanisme de régulation de la dynamique d'interaction du complexe récepteur/ β -arrestine-2 au niveau des endosomes. Cette modulation est médiée par la phosphorylation du résidu Thr178 de β -arrestine-2 par ERK1/2 qui stabilise le complexe arrestine/récepteur et inhibe le recyclage

de ce dernier à la membrane plasmique. Toutefois, le site Thr178 est présent uniquement dans la protéine β -arrestine-2 de rat et n'est pas conservé dans la forme humaine. Notons que les deux mutants phosphomimétiques β -arrestine-2-T178D et K178D (forme de rat et humaine, respectivement) altèrent de manière similaire le trafic des récepteurs.

Ces deux études montrent que la voie ERK1/2, une des voies de signalisation majeures en aval des RCPG, permet l'activation de boucles de rétroaction qui modulent le trafic et donc l'activité signalétique des RCPG.

Ubiquitination

Comme nous l'avons énoncé dans la section 2.6.3, les arrestines jouent un rôle prépondérant dans le cycle d'ubiquitination et déubiquitination des RCPG en servant de plateforme à la fois aux E3-ligases et aux DUB des RCPG. Les arrestines contrôlent ainsi la vitesse de dégradation ou de recyclage des récepteurs.

L'ubiquitination d'arrestine par l'E3-ligase Mdm2 favorise l'internalisation de β 2AR activée par son ligand (235). De manière intéressante, les sites ubiquitinés sur arrestine varient selon le récepteur activé et pourraient donc activer des fonctions physiologiques différentes (269, 270). En revanche, le même schéma d'ubiquitination semble être partagé entre les récepteurs de classe A et les récepteurs de classe B. Les arrestines engagées aux récepteurs de classe A, capables de recycler à la membrane plasmique, sont ubiquitinées de manière transitoire, contrairement aux arrestines en complexe avec les récepteurs de classe B dirigés vers les voies de dégradation lysosomales, dont l'ubiquitination est plus soutenue (269, 270). Cette ubiquitination soutenue semble aussi favoriser la formation de signalosomes au niveau des arrestines, qui engagent par exemple des composants de la voie ERK1/2 (269). Cet aspect sera discuté plus longuement dans la section 3.3.2.

SUMOylation

En 2010, le groupe d'Adriano Marchese démontre pour la première fois la SUMOylation de β -arrestine-2 sur les résidus K295 et K400 (271). La SUMOylation du site majeur, K400, est activée par la stimulation du récepteur β 2AR. Les auteurs émettent l'hypothèse que le

changement de conformation de l'arrestine lors de sa fixation au récepteur activé permet d'exposer le résidu K400 de la queue C-ter à l'enzyme Ubc9. L'inhibition de la SUMOylation d'arrestine, par mutagenèse dirigée ou par baisse de l'expression d'Ubc9, bloque l'internalisation des récepteurs AT1R et β 2AR. Les auteurs soulignent que cette inhibition ne correspond pas à une baisse du recrutement d'arrestine au récepteur mais plutôt à une diminution de son interaction avec un des composants de la machinerie endocytaire : AP-2. Cette étude démontre pour la première fois un rôle de la SUMOylation dans le contrôle du trafic des RCPG.

S-nitrosylation

L'oxyde nitrique (NO) participe à la *S*-nitrosylation des résidus Cys des protéines cibles en convertissant le groupement thiol en *S*-nitrosothiols (*S*-NO) (272). Le temps de demi-vie du NO est très faible et il est synthétisé par les NO synthases (NOS).

Les travaux menés par Jonathan Stamler montrent que β -arrestine-2 est *S*-nitrosylée sur le résidu Cys410 après stimulation du récepteur β 2AR, ce qui n'est pas le cas de β -arrestine-1 (273). Cette *S*-nitrosylation entraîne le découplage du complexe eNOS/arrestine et favorise la liaison d'arrestine à AP-2 et clathrine, ce qui promeut l'internalisation de β 2AR. Après stimulation, β -arrestine-2 est rapidement dénitrosylée. Il est intéressant de noter que dans ce processus, β -arrestine-2 sert aussi de protéine d'échafaudage pour l'enzyme eNOS activée par β 2AR (273) et facilite la *S*-nitrosylation d'autres substrats tels que GRK2 (274) et la dynamine (275). Ainsi, eNOS pourrait permettre la coordination de la régulation de trois éléments majeurs dans l'internalisation et le trafic des RCPG : les GRK, les arrestines et la dynamine.

Précédemment, nous avons discuté du modèle proposé par Robert Lefkowitz où la déphosphorylation de la Ser412 de β -arrestine-1 est pré-requise pour permettre l'interaction de β -arrestine-1 avec la clathrine et l'internalisation du récepteur activé. Or, ce site de phosphorylation n'est pas conservé dans β -arrestine-2. Ozawa et ses collègues proposent que la *S*-nitrosylation de β -arrestine-2 sur Cys410, qui favorise la formation du complexe arrestin/clathrine, pourrait récapituler l'effet obtenu suite à la déphosphorylation de β -arrestine-1 (273).

3. Les arrestines : acteurs de la signalisation des RCPG

Historiquement, les arrestines ont été découvertes comme les protéines permettant l'arrêt de la signalisation par les RCPG. L'internalisation des récepteurs était considérée uniquement comme un moyen de recycler ou au contraire de désensibiliser à long-terme les RCPG. Depuis quelques années, les données expérimentales s'accumulent et démontrent l'importance des arrestines dans l'initiation d'une signalisation post-endocytaire des récepteurs. La diversité des profils de signalisation intracellulaire des récepteurs apporte un niveau de complexité supplémentaire à l'étude de la pharmacologie des RCPG.

3.1. β -arrestine : protéine d'échafaudage pour l'activation des voies de signalisation en aval des RCPG

Les arrestines ont d'abord été décrites comme des protéines adaptatrices dans le cadre de la désensibilisation et de l'internalisation des RCPG activés. Puis en 1999, l'équipe de Robert Lefkowitz publie la première étude mettant en évidence le rôle d'arrestine dans l'initiation d'une deuxième vague de signalisation (276). Dans cette étude, les auteurs démontrent la formation d'un complexe entre le récepteur activé et Src, formé grâce à β -arrestine-1 qui agit comme une plateforme d'interaction. Dans les années qui suivent, des expériences de double-hybrides en levure et de protéomique mettent en évidence un large interactome pour les β -arrestines et ouvrent la voie à l'étude de nouveaux signalosomes reliant les RCPG à des effecteurs indépendants des protéines G (277-280).

3.1.1. Activation des kinases de la famille Src

Src appartient à une famille de neuf non-récepteurs tyrosine-kinases impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la survie, de l'adhésion, du réarrangement du cytosquelette et du trafic vésiculaire. Ces kinases sont activées par des récepteurs membranaires. C'est l'observation de la relocalisation de Src à la membrane plasmique lors du recrutement de β -arrestine au récepteur activé, qui a mis en évidence un nouveau mécanisme de régulation par les RCPG des voies de signalisation des facteurs de croissance.

Description de la famille Src

Les kinases de la famille Src partagent une architecture moléculaire semblable avec un domaine N-ter variable, suivi des domaines SH3 (Src homology 3) et SH2 qui régulent l'activité et l'interaction de Src avec ses partenaires, puis un domaine kinase SH1 et enfin un domaine régulateur C-ter. Les protéines de la famille Src sont cytosoliques et leur activité est régulée via leur recrutement à la membrane plasmique. Src interagit principalement avec le N-domaine d'arrestine via les trois motifs de liaison riches en prolines (PxxP) de son domaine SH3. La mutation de ces motifs est suffisante pour inhiber le recrutement de Src et agit comme dominant négatif de l'activation de ERK1/2 par le récepteur β 2AR (276).

Interaction β -arrestine/Src

Des études de co-immunoprécipitation montrent que l'association de Src avec β -arrestine-1 et son recrutement au récepteur sont agoniste-dépendants (276, 281). Le complexe récepteur/arrestine/Src se forme à la membrane plasmique et cela ne nécessite pas l'internalisation du récepteur (276). Le complexe est régulé par la phosphorylation par ERK1/2 de β -arrestine-2 au niveau de la Ser412. L'utilisation d'un mutant phosphomimétique S412D bloque la formation du complexe arrestine/Src, alors que le mutant non-phosphorylable S412A n'a pas d'effet (276). Ainsi, la déphosphorylation d'arrestine induite par le ligand pourrait fournir un mécanisme de régulation de l'activation de Src par les RCPG (266).

Rôles fonctionnels du complexe arrestine/Src

Les protéines de la famille Src sont impliquées dans la voie de prolifération cellulaire Ras/MAPK (282). Cette voie, induite par les RTK, a été largement étudiée pour son rôle dans l'oncogenèse (283). Src est aussi impliquée dans d'autres processus tels que la survie cellulaire, l'adhésion cellulaire, le réarrangement du cytosquelette ainsi que le trafic vésiculaire (284). Les RCPG activent Src via différents modes : protéines G, transactivation des RTK et arrestine.

Tout comme pour ERK, l'activation de Src par arrestine semble permettre un contrôle spatio-temporel de son activité kinase ainsi qu'une activation ciblée de certains substrats cytoplasmiques (voir section 3.1.2 pour plus de détails). Le complexe arrestine/Src permet la

régulation des protéines impliquées dans le contrôle de l'endocytose des RCPG : GRK2, dynamine et AP-2. Ce complexe régule aussi les kinases d'adhésion focale (FAK, Pyk2 et paxilline) modulant ainsi la dynamique du cytosquelette et la migration cellulaire (285).

3.1.2. Voie ERK/MAPK

La dualité de fonction des arrestines est parfaitement illustrée dans l'étude menée par Tohgo et ses collègues qui montre que la surexpression de β -arrestine-1 ou β -arrestine-2 entraîne une diminution de la production d'inositol-phosphate suite à la stimulation d'AT1R. Ces résultats s'expliquent par une accélération du découplage de la protéine Gq, alors que l'activation de ERK1/2 est potentialisée (286). Les arrestines participent donc à la fois à la désensibilisation du récepteur et à l'activation d'une signalisation indépendante des protéines G.

Description de la voie ERK/MAPK

La famille MAPK regroupe un ensemble de Ser/Thr kinases impliquées majoritairement dans la transduction de signaux extracellulaires régulant la croissance cellulaire, la division, la différenciation et l'apoptose. Les cellules de mammifères expriment trois MAPK : ERK1/2, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase) et p38/HOG1 [Figure 17]. La voie des MAPK est organisée en une cascade de phosphorylations activatrices. Dans la voie ERK/MAPK : cRaf-1, B-Raf et A-Raf activent par phosphorylation MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2) qui activent alors ERK1/2. Une fois activées, ERK1/2 phosphorylent de nombreux substrats qui peuvent être membranaires, cytoplasmiques ou encore nucléaires. Dans de nombreux cas, l'activation des MAPK est facilitée par des protéines d'échafaudage qui facilitent l'engagement de la cascade de phosphorylation, tout en permettant de cibler un compartiment cellulaire spécifique. Les arrestines font partie de ces protéines d'échafaudage qui permettent l'activation des voies MAPK.

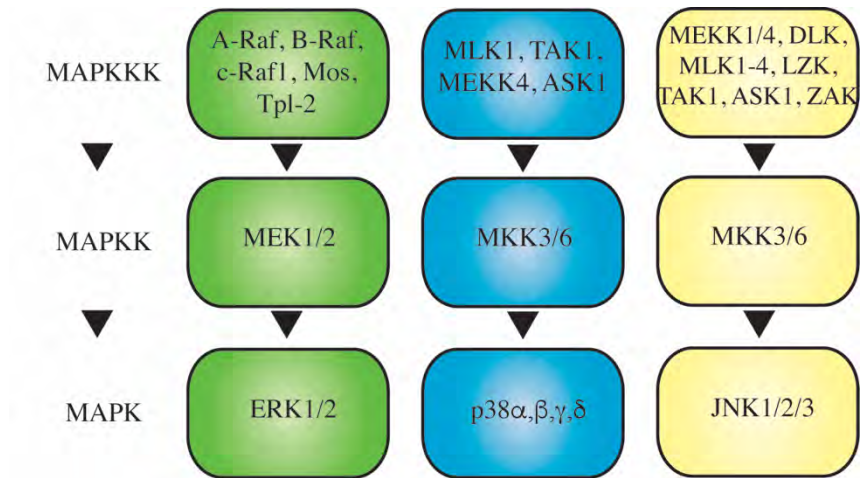


Figure 17. Cascades MAPK

Représentation des trois principales cascades MAPKKK-MAPKK-MAPK chez les mammifères. Adaptée de (245).

Interaction β -arrestine/Raf-MEK-ERK

L'engagement par β -arrestine-2 des trois composants de la cascade : c-Raf/MEK1/ERK2 après stimulation d'AT1R est initialement démontrée par co-immunoprécipitation (287). Des travaux ultérieurs montrent la liaison de c-Raf, MEK1 et ERK2 aux quatre sous-types d'arrestines sur leurs N-domaines ou C-domaines, sans que les sites d'interaction ne soient précisément cartographiés (288, 289). L'utilisation de mutants de conformation des arrestines qui imitent la conformation libre, couplée au récepteur ou associée aux microtubules, met en évidence une affinité plus forte de ERK1/2 pour la forme d'arrestine couplée au récepteur ou aux microtubules que pour sa forme libre. Raf présente le même biais dans son affinité bien que la différence soit moins marquée, alors que MEK1 a une affinité équivalente pour les trois formes d'arrestines (288). Ainsi, le recrutement d'arrestine aux récepteurs facilite l'activation de la voie ERK/MAPK. Au contraire, à l'état basal, arrestine associée aux microtubules se lie préférentiellement à ERK et Raf, mais pas à MEK, ce qui permet de modérer le niveau basal d'activation de la voie (290, 291). ERK1/2 activées et liées aux arrestines sont aussi protégées de l'inactivation par les phosphatases, ce qui permet une activation plus soutenue de la voie (292).

Contrôle temporel et spatial de l'activation de ERK1/2

Dans la cellule, de nombreuses voies de signalisation convergent vers l'activation de ERK1/2, et sont engagées suite à l'activation des RCPG ou des RTK. Bien que l'activation de ERK1/2 par les RCPG puisse varier en fonction du type cellulaire et du récepteur, il est généralement admis que les protéines G et les arrestines participent à celle-ci (293). La contribution de chacune de ces voies à l'activation de ERK1/2 par AT1R a été élégamment démontrée à l'aide d'ARN interférents, d'inhibiteurs pharmacologiques, de récepteurs mutants incapables d'engager les protéines G et de ligands sélectifs pour l'activation des voies dépendantes d'arrestines (294, 295). Lors de la baisse de l'expression de β -arrestine-2, l'activation de ERK1/2 par AT1R devient transitoire et sensible à l'inhibition de la PKC indiquant une activation médiée par l'axe Gq/11-PLC β -PKC. Réciproquement, l'inhibition de PKC bloque le pic initial d'activation de ERK1/2, mais ne bloque pas la phase plus tardive. De la même manière, l'utilisation du mutant AT1R-DRY/AAY ou du ligand [Sar¹-Ile⁴-Ile⁸]-AngII,

qui ne permettent pas le couplage avec Gq, conduit à une activation tardive et soutenue de ERK1/2 insensible à l'inhibiteur de PKC, mais qui est abolie par l'utilisation d'un ARNi dirigé contre β -arrestine-2. Ainsi, la voie qui mène à l'activation de ERK1/2 dicte la cinétique d'activation de cette kinase.

La formation du complexe de signalisation, ou signalosome, au niveau des arrestines permet aussi de contrôler la distribution subcellulaire de la forme activée des ERK1/2. De manière classique, une fois activé par les RTK ou les protéines, les kinases ERK1/2 migrent dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription, tel que Elk1. En revanche, lorsqu'elles sont activées par arrestine, ERK1/2 restent piégées au niveau du signalosome, au moins pour les récepteurs de classe B qui forment un complexe stable. Leur translocation au noyau est donc retardée, ce qui favorise la phosphorylation de cibles cytoplasmiques (287). Par exemple, après activation du récepteur PAR2, il est estimé que 75-80% du réservoir de ERK1/2 activées reste associé au complexe PAR2/arrestine (296). Ainsi, la voie qui mène à l'activation de ERK1/2 dicte aussi l'activité spatiale de la kinase.

Cibles nucléaires ou cibles membranaires et cytoplasmiques de ERK1/2

Les arrestines sont au centre du contrôle spatio-temporel de l'activité de ERK1/2 et permettent une régulation de l'activité transcriptionnelle et proliférative de la cellule. Par exemple, l'activation de ERK par le récepteur PAR2 est majoritairement dépendante des arrestines ; en conséquence elle ne permet pas l'activation des facteurs de transcription nucléaires et donc de la prolifération cellulaire. En revanche, le mutant de phosphorylation PAR2-ST363/366A, qui montre une baisse de sa désensibilisation et de son internalisation due à un défaut de recrutement d'arrestine, active ERK1/2 majoritairement via les protéines G ce qui entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (296). Cet effet est moins prononcé pour les récepteurs de classe A qui se dissocient rapidement d'arrestine lors de l'endocytose, et permettent donc la translocation de ERK1/2 dans le noyau. Ainsi, lors de la stimulation du récepteur chimérique V2 β 2AR⁸, qui se comporte comme un récepteur de classe A, la proportion

⁸ Récepteur V2R dans lequel la queue C-ter a été tronquée et remplacée par celle du β 2AR

de ERK1/2 activées qui migre vers le noyau est plus importante qu'avec V2Rwt, ce qui entraîne une augmentation significative de la prolifération cellulaire (297).

La forme activée de ERK1/2 liée à arrestine joue un rôle dans la désensibilisation des RCPG, le réarrangement du cytosquelette et la traduction des protéines. Plusieurs mécanismes de régulation par ERK de la désensibilisation des RCPG ont été mis à jour. Premièrement, la phosphorylation de GRK2 par ERK1/2 sur la Ser670 est favorisée par arrestine et augmente la vitesse de dégradation de GRK2, réduisant ainsi son activité (298, 299). Deuxièmement, la phosphorylation de β -arrestine-1 par ERK1/2 sur la Ser412 inhibe l'internalisation du récepteur et bloque son interaction avec c-Src (voir section 2.7.2). Ces deux mécanismes constituent une boucle de régulation négative de l'activation de ERK1/2 via le signalosome arrestine.

Arrestine joue aussi un rôle dans la chimiotaxie, processus par lequel une cellule se déplace en fonction du gradient de concentration d'une molécule donnée. Cette chimiotaxie implique la formation d'un pseudopodium qui se déplace dans la direction du gradient et qui nécessite à la fois la polymérisation de F-actine et la force contractile des filaments d'actine-myosine. Plusieurs études démontrent le rôle de l'activation de ERK1/2 au niveau du bord d'attaque de la cellule dans le contrôle de la chimiotaxie induite par les RCPG. ERK1/2 phosphorylent directement des acteurs de la réorganisation de l'actine, tels que les protéines Wave/Scar (300), les chaînes légères de myosines (301), des protéines de la matrice extracellulaire (302) ou des effecteurs des RhoA-GTPases. Ces événements participent à l'assemblage localisé de l'actine et à l'extension du pseudopodium. L'importance du complexe récepteur/arrestine/ERK a été soulignée dans plusieurs études. Par exemple, les splénocytes (globules blancs présents au niveau de la rate) répondent à un gradient de CXCL12 lorsqu'ils sont mobilisés au niveau d'un site d'inflammation. Cette réponse, médiée par le récepteur CXCR4, est fortement diminuée dans des MEF extraites de souris KO pour β -arrestine-2 (303). De la même manière, la réponse chimiotaxique des cellules de cancer du sein MDA, médiée par PAR2, requiert l'activation du complexe PAR2/arrestine/ERK pour le réarrangement du réseau d'actine au niveau du pseudopodium (304, 305).

Enfin, le complexe arrestine/ERK joue un rôle dans la traduction des protéines en phosphorylant des protéines telles que RSK1/2 (p90 Ribosomal S6 Kinase 1/2) (306, 307) et

Mnk1 (MAP kinase-interacting kinase 1), qui régulent le complexe d'initiation de la traduction (308). De manière intéressante, une étude publiée par Strachan *et al.* (309) rapporte que la phosphorylation du récepteur 5-HT_{2A} par RSK2 inhibe la réponse du récepteur (mobilisation du Ca²⁺) suite à l'activation par son ligand. Cette étude suggère l'existence d'une voie de rétrocontrôle des RCPG par ERK, médiée par RSK. Toutefois, le mécanisme sous-jacent n'a pas été déterminé.

3.1.3. Voie JNK/MAPK

Interaction β -arrestine/Ask1-MKK4-JNK3

Dans le cas de la voie Ask1-MKK4-JNK3, les quatre sous-types d'arrestines, quel que soit leur état conformationnel, lient de manière équivalente les trois composants de la voie, et permettent une relocalisation de JNK du noyau vers le cytoplasme (310). En revanche, seule β -arrestine-2 active efficacement JNK (311, 312). Les résultats initiaux de McDonald et ses collègues (313) démontrent que β -arrestine-2 se lie directement à ASK1 et JNK3, alors que MKK4 est recruté au complexe via son interaction avec les deux kinases mais pas arrestine. Ces données ont ensuite été remises en question dans plusieurs études qui ont démontré une interaction directe des trois composants de la cascade avec β -arrestine-2 (288, 314).

β -arrestine-2 présente une affinité plus forte pour Ask1 et JNK3 que les autres sous-types d'arrestines. La liaison de ces deux composants à β -arrestine-2 augmente l'affinité de MKK4. Cette différence entre les isoformes expliquerait pourquoi seule β -arrestine-2 active efficacement la voie (314, 315). L'étude publiée par Breitman et ses collègues (315) souligne aussi l'importance d'une orientation optimale des kinases dans le complexe avec arrestine pour faciliter l'activation de JNK3. Or, cette orientation pourrait varier selon les isoformes d'arrestine et n'être optimale qu'avec β -arrestine-2.

Finalement, JNK3 phosphorylé et activé suite à la stimulation du récepteur β 2AR, colocalise avec β -arrestine-2 au niveau de vésicules cytoplasmiques, montrant que l'activation de cette voie est subséquente à l'internalisation des RCPG (313).

Activation de JNK1 et JNK2

JNK1 et JNK2 sont exprimés de manière ubiquitaire, contrairement à JNK3 qui est principalement exprimé dans les neurones, le cœur et les testicules (316). Étant donné le fort niveau de conservation entre les différents isoformes de JNK, la question de l'activation de JNK1 et JNK2 par β -arrestine-2 a rapidement été soulevée. Des expériences de liaison *in vitro*, utilisant des protéines purifiées, démontrent la liaison de JNK2 à β -arrestine-2 avec une affinité identique à JNK3, et celle de JNK1 avec une affinité plus faible (317). Dans cette même étude, les auteurs montrent que l'activation de JNK1/2 par Ask1, MKK4 et MKK7 augmente avec l'expression de β -arrestine-2. Toutefois, ce phénomène est bi-phasique et une forte expression d'arrestine conduit à une diminution de l'activation de JNK1/2 (317). L'ensemble de leurs résultats démontre que β -arrestine-2 active JNK1, JNK2 et JNK3 et régule positivement ou négativement cette activation dans un grand nombre de types cellulaires.

Rôles fonctionnels du complexe arrestine/JNK

La manière dont arrestine influence les rôles cellulaires des kinases JNK reste encore peu connue. Les protéines de la famille JNK régulent de nombreux processus essentiels dont la mort et la survie cellulaire (318). En particulier, l'activation de JNK3 joue un rôle central dans l'activation de la mort cellulaire et est impliquée dans plusieurs pathologies neurodégénératives (319-321), suggérant que son inhibition pourrait représenter une cible thérapeutique d'intérêt. L'utilisation de protéines d'échafaudage mutantes, telle qu'arrestine, pourrait permettre d'inhiber l'activation de JNK ou encore de forcer sa relocalisation subcellulaire dans un compartiment donné de la cellule (322) et ainsi d'étudier plus précisément son rôle dans le développement de ces pathologies.

3.1.4. Voie PI3K/Akt

Description de la voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt joue un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire et est directement impliquée dans l'homéostasie cellulaire (323). Cette voie est activée par des récepteurs membranaires (RTK ou RCPG), et une mutation activatrice d'un des ses composants

peut favoriser le développement tumoral. La kinase PI3K se compose d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85. PI3K phosphoryle les phosphoinositides membranaires et conduit à la formation de PIP₃. PIP₃ sert alors de ligand pour recruter Akt à la membrane, où Akt est phosphorylée par la sérine/thréonine kinase phosphatidylinositol-3-dépendante 1 (PDK1).

Akt est une sérine/thréonine kinase qui active mTOR (mammalian target of rapamycin) par phosphorylation d'un complexe composé de TSC1 (tuberous sclerosis complex 1) et TSC2 (324). mTOR joue un rôle primordial dans la régulation de la croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire, principalement via la régulation du facteur d'initiation de la traduction eIF4E et de la protéine kinase S6 (S6K1). Il participe aussi au réarrangement du cytosquelette en activant la voie PKC. De nombreux autres substrats sont phosphorylés et régulés par Akt, convergeant vers l'activation des processus de croissance, survie et prolifération cellulaire. Akt est inhibée de manière directe par PP2A qui déphosphoryle les sites d'activation d'Akt.

Suppresseur de tumeur PTEN

PTEN (phosphatase and tensin homolog) est composé d'un domaine catalytique, d'un domaine C2 de liaison à la membrane et d'une queue C-terminale régulatrice contenant de multiples sites de phosphorylation (325). PTEN est la principale phosphatase qui transforme PIP₃ en PIP₂ et donc inhibe le recrutement et l'activation d'Akt en contrebalançant l'activité de la PI3K. Diverses anomalies génétiques conduisent à une perte de fonctions de PTEN dans de nombreux cancers (326) ainsi que d'autres maladies, telle que le syndrome de Cowden (327). Par exemple, l'activité thérapeutique du Trastuzumab utilisé dans le traitement de cancers du sein surexprimant ERBB2 repose sur l'activation de PTEN, dont la perte de PTEN induit une résistance au traitement (328).

Le statut de phosphorylation de PTEN contrôle son activité. PTEN est phosphorylé de manière constitutive par CKII, ce qui induit une interaction intramoléculaire entre la queue C-terminale et les domaines catalytique et C2 (329, 330). Cette conformation fermée est inactive. La mutation des sites de phosphorylation Ser380, Thr382, Thr383 et Ser385 du domaine C-ter

déstabilise l'interaction intramoléculaire (331). Cette conformation ouverte présente une activité catalytique et une localisation membranaire augmentées.

PTEN est aussi phosphorylé au niveau de son domaine C2 par la kinase ROCK, activée par RhoA (332). Cette phosphorylation augmente aussi son activité catalytique et sa localisation à la membrane. Au contraire, la phosphorylation de PTEN par Src, toujours au niveau du domaine C2, inhibe la localisation membranaire de PTEN conduisant à une augmentation de la signalisation PI3K/Akt (333).

Activation d'Akt par arrestines

Le rôle de β -arrestine-1 dans l'activation d'Akt en aval des RTK a été démontré par Povsic et ses collègues et corrèle avec une augmentation de l'activité anti-apoptotique du RTK IGF-1R. L'activation d'Akt par les β -arrestines a été rapportée en aval de plusieurs RCPG comme le récepteur à la ghréline (334) et PAR1 (335). Luan et ses collègues proposent un modèle dans lequel l'activation d'Akt par β -arrestine passe par le recrutement du complexe arrestine/Src/Akt au récepteur activé (336).

Interaction β -arrestine/Akt/PP2A

Les arrestines jouent aussi un rôle de régulateur négatif de la voie PI3K/Akt. En effet, les deux sous-types β -arrestine-1 et β -arrestine-2 inhibent l'activité de la PI3K après stimulation du récepteur PAR-2 (337). La phosphatase PP2A a été identifiée comme un interacteur β -arrestine-2 lors d'un criblage protéomique (338) et le complexe natif β -arrestine-2/PP2A/Akt a été purifié à partir de tissu du striatum de souris (339). Le recrutement de PP2A à Akt, après stimulation d'un RCPG, entraîne la désactivation d'Akt et donc l'inhibition de la voie PI3K/Akt.

Interaction β -arrestine/PTEN

En 2010, Palmitessa et ses collègues démontrent que l'unique orthologue d'arrestine chez *C. elegans* interagit avec l'orthologue de PTEN, DAF-18 (340). En 2011, Lima-Fernandes et ses collègues montrent que cette association est conservée chez l'Homme (341). Cette interaction augmente l'activité lipide-phosphatase de PTEN *in vitro* ou après stimulation de la

voie RhoA/ROCK dans les cellules, réduisant ainsi l'activité d'Akt et la prolifération cellulaire (341).

Ainsi les arrestines peuvent stimuler ou inhiber la voie PI3K/Akt à différents niveaux, permettant une régulation précise de la voie en fonction des signaux reçus par la cellule et du contexte biologique.

3.1.5. Voie NF κ B

Description de la voie NF κ B

NF κ B (nuclear factor-kappa B) est un facteur de transcription impliqué dans la transcription de gènes anti-apoptotiques. La protéine NF κ B est régulée par la formation d'un complexe avec la protéine inhibitrice I κ B α . Lorsque inactivé, ce complexe est maintenu dans le cytoplasme. La phosphorylation d'I κ B α par les kinases I κ K accélère son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, favorisant la libération de NF κ B et sa translocation dans le noyau (342).

À ce jour, des centaines de modulateurs de la voie NF κ B ont été rapportés dans la littérature et la transcription de plusieurs centaines de gènes est modulée par ces protéines (343).

Régulation de l'activité de NF κ B par les arrestines

La diminution de l'expression de β -arrestine-1 est suffisante pour induire une augmentation de l'activité de NF κ B en réponse au TNF α (344). Au contraire, la stimulation du récepteur β 2AR, promeut la formation d'un complexe entre β -arrestine-2 et I κ B α , qui stabilise cette dernière et donc inhibe l'activité NF κ B (345). Ainsi, il a été proposé que les β -arrestines forment un complexe avec I κ B, qui peut être induit par la stimulation d'un RCPG. Ce complexe stabilise la protéine inhibitrice I κ B et conduit à la rétention de NF κ B dans le cytoplasme, bloquant ainsi son activité.

3.1.6. Translocation nucléaire d'arrestine et régulation de la transcription

Séquences d'export et d'import nucléaires

À l'état basal, β -arrestine-1 est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme alors que β -arrestine-2 est exclue du noyau (346). Les deux β -arrestines transloquent entre le noyau et le cytoplasme, et s'accumulent dans le noyau après traitement des cellules avec l'inhibiteur d'export nucléaire leptomycine B. β -arrestine-1 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) et la mutation de ce NLS, ou du résidu Lys157 uniquement, suffit à l'exclure du noyau, ainsi qu'à inhiber l'activation de NF κ B induite par le récepteur à la bradykinine (347). β -arrestine-2 possède à la fois une séquence de localisation nucléaire (NLS) et une séquence d'export nucléaire (NES) et est exclue du noyau à l'état basal. Suite à la mutation de son NES, β -arrestine-2 s'accumule dans le noyau ce qui suggère un export actif de cette protéine (348).

Régulation de la transcription

Les différences dans le transport nucléaire de β -arrestine-1 et 2 leur confèrent des fonctions différentes dans la régulation de la transcription. La localisation cytoplasmique de β -arrestine-2 permet de piéger certains régulateurs de la transcription dans le cytoplasme et ainsi inhiber leurs fonctions nucléaires. β -arrestine-2 interagit par exemple avec l'ubiquitine E3-ligase Mdm2 et réduit sa localisation nucléaire. Or, dans le noyau, Mdm2 induit l'ubiquitination et donc la dégradation du facteur de transcription p53. L'export nucléaire de Mdm2 par β -arrestine-2 augmente donc l'expression nucléaire et l'activité de p53 (349). La mutation du NES de β -arrestine-2 (L394Q) conduit à une accumulation de la forme mutante de β -arrestine-2 dans le noyau mais aussi à une relocalisation nucléaire de JNK et Mdm2 (310).

Une étude démontre aussi le rôle de β -arrestine-1 comme régulateur épigénétique (350). L'activation du récepteur δ -opioïde induit la translocation de β -arrestine-1 dans le noyau et l'augmentation de la transcription des gènes *c-Fos* et *p27*, ainsi que la potentialisation de la prolifération cellulaire. Les auteurs démontrent que β -arrestine-1 s'accumule au niveau du

promoteur de ces gènes et permet le recrutement de l'histone acétyltransférase p300. P300 augmente alors l'acétylation des histones H4 environnantes et stimule la transcription.

Une autre étude démontre la translocation nucléaire de β -arrestine-2 induite par l'activation du récepteur olfactif humain hOR17-4 dans les spermatozoïdes matures et démontre l'importance de cette translocation dans la régulation de l'expression des gènes lors du processus de fertilisation (351).

Les β -arrestines permettent donc la régulation directe de la transcription des gènes en servant de protéines d'échafaudage qui régulent la concentration locale de facteurs de transcription et autres régulateurs, au niveau des promoteurs de certains gènes cibles.

3.2. Signalisation endosomale des RCPG

3.2.1. Signalisation des protéines G depuis les endosomes

Classiquement, après stimulation par le ligand, la signalisation par les protéines G à la surface de la cellule est rapidement stoppée par les arrestines qui bloquent la liaison RCPG/protéine G par effet stérique et conduisent à l'internalisation du récepteur. Ce paradigme selon lequel les signaux provenant des protéines G émanent de la membrane plasmique alors que ceux provenant des arrestines se produisent au niveau des récepteurs internalisés, et ceci de manière mutuellement exclusive, est remis en question par les découvertes de ces dernières années. Plusieurs études rapportent l'engagement des RCPG dans une activation soutenue des protéines G émanant des récepteurs internalisés, plutôt qu'une désensibilisation rapide de ce signal, après stimulation par l'agoniste [Tableau I] (352-357).

En 2009, une première étude dirigée par Martin Lohse (352), utilise un modèle de souris transgénique qui exprime de manière ubiquitaire un biosenseur permettant de suivre la production d'AMPC. Ce biosenseur « CAG-EPAC1-camps » est basé sur la technique du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET). Il est composé d'une protéine fluorescence jaune YFP, du domaine de liaison à l'AMPC de la protéine EPAC1 et d'une protéine fluorescente cyan CFP, le tout sous le contrôle d'un promoteur CAG La fixation de

Tableau I. RCPG présentant une signalisation soutenue via les protéines G

Adapté de (245)

Récepteur	Classe	Ligand	Protéine G	Références
PTHrP	B	Hormone parathyroïdienne	Gs, Gq, Gi	(353, 355, 358, 359)
S1P1R	A	Sphingosine 1-phosphate	Gs, Gi/o	(357)
β 2AR	A	Isoproterenol	Gs	(356)
TSHR	A	Hormone thyroïdienne	Gs, Gq/11	(352)
GLP1R	B	Glucagon-like peptide	Gs	(360)
PACAP1R	B	Polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire	Gs	(361)
V2R	A	Vasopressine	Gs	(354)
CRHR1	B	Hormone corticotrope	Gs	(362)
D1R D2R D3R	A	Dopamine	Gs	(363)

l'AMPc sur ce biosenseur entraîne l'ouverture de ce dernier qui se traduit par une diminution du signal de FRET. Le signal AMPc est ensuite mesuré dans des cultures primaires de follicules thyroïdiens en 3D. Les résultats obtenus montrent que l'internalisation dépendante de β -arrestine du récepteur à l'hormone thyroïdienne (TSHR) suite à la stimulation par l'agoniste n'est pas associée à une diminution de la production d'AMPc. Les auteurs démontrent aussi la présence dans les vésicules post-endocytiques de la protéine G α s et de l'adénylyl-cyclase. La nature du signal dépendant de la protéine G α s qui émane des endosomes diffère du signal provenant de la membrane plasmique puisqu'il est soutenu et non transitoire. Or, la persistance de ce signal après stimulation du récepteur serait essentielle au bon fonctionnement de la fonction sécrétoire thyroïdienne (352). Peu après la publication de ces travaux, une autre étude (364) confirme la production soutenue d'AMPc suite à l'activation du récepteur TSHR mais rapporte que ce signal est indépendant de l'internalisation du récepteur.

Rapidement, d'autres études suivront, démontrant elles aussi une persistance du signal AMPc après internalisation de différents RCPG. En 2009, Ferrandon et ses collègues (355) montrent que l'activation du récepteur PTHR par ses deux ligands naturels : l'hormone endocrine PTH et le facteur autocrine PTHrP conduisent à un profil d'activation de l'AMPc différent. PTHrP induit une activation transitoire de l'AMPc et restreinte à la membrane plasmique, alors que PTH induit une activation soutenue et que le complexe PTHR/PTH internalise tout en restant associé à la protéine G α s. En 2013, le même groupe propose un modèle selon lequel arrestine permet la stabilisation de la signalisation Gs soit par la formation d'un complexe stable PTHR/arrestine avec la protéine hétérotrimérique Gs sous forme active, soit par une stabilisation du complexe PTHR/arrestine avec les sous-unités G $\beta\gamma$ uniquement et qui permettrait d'accélérer les cycles d'activation de la protéine G α s après hydrolyse du GTP (358). Cette année-là, ils rapportent aussi un mécanisme similaire d'activation de l'AMPc par la protéine G α s après activation et internalisation du récepteur V2R (354).

Ces études sur les récepteurs PTHR et V2R suggèrent un rôle positif d'arrestine sur le maintien de la signalisation endosomale par la protéine G α s. En effet, la diminution de l'expression de β -arrestine-1 ou β -arrestine-2 à l'aide d'ARN interférent inhibe la phase soutenue de production d'AMPc, alors que l'effet inverse est observé lors de la surexpression de β -arrestine-1 (353,

354). En 2016, une autre étude (365) confirme ces résultats en montrant que V2R, récepteur de classe B qui interagit de manière stable avec arrestine, promeut une meilleure activation de la production d'AMPC depuis les endosomes que β 2AR, récepteur de classe A qui se dissocie d'arrestine lors de son internalisation. D'autre part, le récepteur chimérique β 2V2R, qui présente les mêmes caractéristiques d'internalisation que V2R, active de manière plus efficace la production soutenue d'AMPC comparativement au récepteur β 2AR.

Simultanément, Mullershausen et ses collègues (357) démontrent que le récepteur à la sphingosine S1P1R, couplé G_i , continue d'inhiber la production d'AMPC induite par la forskoline 60 minutes après stimulation du récepteur par l'agoniste, et cela malgré une internalisation substantielle des récepteurs. De plus, ils montrent qu'après une pré-incubation des cellules avec l'agoniste FTY720P suivi d'un lavage de cinq heures, les récepteurs stimulés avec FTY720P continuent d'inhiber la production d'AMPC induite par la forskoline, ce qui corrèle avec la localisation endosomale des récepteurs. De manière intéressante, cette étude démontre que toutes les voies de signalisation induites par les protéines G ne sont pas maintenues après l'internalisation. En effet, S1P1R est aussi couplé à la protéine G_q qui stimule la réponse calcique mais cette mobilisation du Ca^{2+} induite par l'agoniste nécessite la localisation membranaire du récepteur activé et n'est pas maintenue après le lavage des cellules.

En 2013, Le groupe de Mark Von Zastrow publie une étude très élégante (356) dans laquelle ils utilisent des biosenseurs conformationnels qui leurs permettent de démontrer clairement la production d'un signal AMPC depuis les endosomes. Pour cela, ils utilisent un fragment d'anticorps à domaine unique, ou « nanobody », couplé à une protéine fluorescente verte (Nb80-GFP) qui reconnaît spécifiquement la forme activée du récepteur β 2AR. Instantanément après la stimulation du récepteur, Nb80-GFP est recruté à la membrane plasmique, et quelques minutes plus tard, s'accumule au niveau des endosomes contenant le récepteur β 2AR. Un autre biosenseur, Nb37-GFP, permet cette fois se suivre spécifiquement un intermédiaire d'activation de la protéine $G_{\alpha s}$. De la même manière, à l'état basal Nb37-GFP présente une localisation cytoplasmique diffuse, et est rapidement recruté à la membrane plasmique après stimulation du récepteur β 2AR, puis transloque vers les endosomes. Les auteurs démontrent aussi que la deuxième phase de production d'AMPC est dépendante de l'internalisation du récepteur,

puisqu'elle est inhibée suite à l'utilisation d'un mutant $\beta 2AR-3S$, déficient pour l'endocytose, ou par le traitement des cellules avec l'inhibiteur de l'internalisation Dyngo-4a.

Toutes ces études mettent en évidence l'existence d'un complexe RCPG/protéine G au niveau des endosomes capable d'activer de manière prolongée certaines voies de signalisation. Toutefois, ces études ne permettent pas encore de concilier l'interaction des récepteurs avec les arrestines et les protéines G, qui jusqu'alors sont considérées comme mutuellement exclusives ; ceci étant particulièrement pertinent pour les récepteurs de classe B qui forment un complexe stable avec arrestine dans les endosomes. De plus, il serait intéressant de voir si ce modèle peut être élargi à un plus grand nombre de protéines G et de voies de signalisation, les études portant principalement sur l'activation de la production d'AMPc par $G_{\alpha s}$. Il serait aussi pertinent de confirmer la présence, et définir le rôle, des sous-unités $G\beta\gamma$ au niveau de ce complexe ; et de déterminer la possibilité pour ces sous-unités d'activer des voies de signalisation.

3.2.2. Super-complexe RCPG/protéine G/arrestine

Les travaux conduits en collaboration par Roger Sunahara, Georgios Skiniotis, Michel Bouvier et Robert Lefkowitz (365) démontrent l'existence d'un super-complexe endosomal regroupant le récepteur, la protéine G et arrestine. Cette découverte s'appuie d'abord sur les données cristallographiques récentes qui proposent l'existence d'un mode de liaison séquentiel d'arrestine au récepteur activé (voir section 2.3.2). Selon ce modèle (37), il existe une première conformation où seul le N-domaine d'arrestine interagit avec la queue C-ter du récepteur, et une deuxième dans laquelle arrestine est complètement engagée et interagit aussi avec le cœur du récepteur. Or, dans la conformation partiellement engagée, les boucles intracellulaires i1, i2 et i3 sont libres et donc les sites d'interaction du RCPG avec les protéines G sont potentiellement accessibles. Dans cette publication, les auteurs démontrent par cryo-microscopie électronique l'existence d'un complexe $\beta 2V2R$ /arrestine/ G_s , où le récepteur interagit simultanément avec arrestine via son extrémité C-ter, et avec la protéine hétérotrimérique G_s via ses boucles intracellulaires [Figure 18]. Les données obtenues par BRET confirment l'existence de ce super-complexe dans un environnement cellulaire et démontrent que le récepteur $\beta 2V2R$ fusionné à

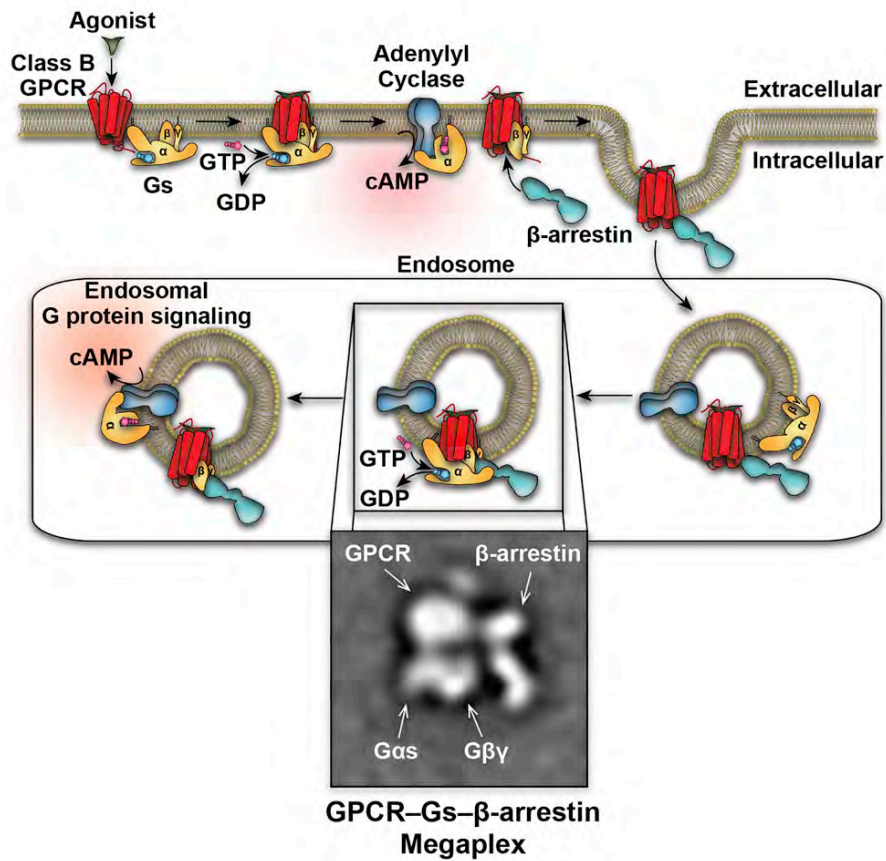


Figure 18. Supercomplexe récepteur/arrestine/protéine G

Après stimulation par son agoniste, le RCPG de classe B active les protéines G à la membrane plasmique, ce qui conduit à la production de messagers secondaires, tel que l'AMPc pour Gs. β-arrestine est ensuite recrutée à la membrane et permet l'internalisation du récepteur. Après internalisation, se forme un supercomplexe récepteur/arrestine/protéine G au niveau des endosomes permettant de maintenir l'échange GDP/GTP au niveau de la sous-unité Gsα et donc une production soutenue d'AMPc. Les images de cryo-EM mettent en évidence l'interaction du récepteur avec Gs via son cœur central, et avec β-arrestine via sa queue C-ter. Adaptée de (365).

β -arrestine-2 conserve sa capacité d'activation de la protéine Gs après stimulation par le ligand.

Comme discuté par les auteurs, la question de l'existence d'un tel complexe pour les récepteurs de classe A, tels que β 2AR, se pose puisque l'interaction entre la queue C-ter du récepteur et arrestine est alors beaucoup moins forte. Ainsi, il reste à démontrer si un tel mécanisme est engagé lors de l'activation de la production d'AMPc par les récepteurs β 2AR internalisés tel que décrit par Mark Von Zastrow (356).

Les travaux subséquents publiés en 2017 (366) montrent que les récepteurs de classe B, tels que le V2R ou le chimère β 2V2R, en complexe avec arrestine partiellement engagée, peuvent internaliser et activer les voies de signalisation dépendante d'arrestine (l'interaction et l'activation de c-Src ayant été testée par les auteurs), mais ne permet pas la désensibilisation du récepteur. Ces résultats sont donc compatibles avec le modèle du super-complexe, qui autorise l'activation des voies de signalisation dépendantes des protéines G. Une autre étude publiée par le groupe d'Arun Shukla corrobore ces données (367). Dans cette étude, les auteurs utilisent un récepteur V2R où la boucle intracellulaire i3 est supprimée ($V2R\Delta i3$). Ils montrent que ce mutant forme un complexe avec β -arrestine-1 via sa queue C-ter phosphorylée uniquement. Ce complexe $V2R\Delta i3/\beta$ -arrestine-1 est capable d'interagir avec la clathrine et ERK *in vitro*, ainsi que d'internaliser et de promouvoir l'activation de ERK1/2 après stimulation par l'agoniste *in cellulo*.

Ces deux études utilisent le récepteur V2R comme récepteur modèle. Or, pour les récepteurs de classe A, tel que β 2AR, la conformation partiellement engagée du complexe récepteur/arrestine, est trop instable pour permettre la désensibilisation, l'internalisation ou encore l'activation des voies de signalisation après stimulation du récepteur. La question du mécanisme moléculaire responsable de la signalisation endosomale dépendante des protéines G pour les récepteurs de classe A reste donc à explorer.

3.2.3. Les rétromères : régulateurs de la signalisation endosomale des protéines G

Classiquement, les arrestines sont considérées comme les régulateurs négatifs de la signalisation des protéines G à la surface de la cellule. Dans le cas de la signalisation endosomale, elles semblent plutôt jouer un rôle de régulateur positif de la signalisation des protéines G. Se pose alors la question de l'existence d'un mécanisme de désensibilisation de la signalisation endosomale des récepteurs.

Le complexe rétromère

Le rétromère est un complexe protéique fortement conservé dont la fonction primaire est le tri des cargos depuis les endosomes vers le *trans*-Golgi (368). Chez l'Homme, ce complexe est composé d'une sous-unité de reconnaissance des cargos comprenant Vsp26, Vsp29 et Vsp35 et d'une sous-unité permettant la formation des tubules au niveau de la membrane endosomale comprenant SNX et BAR (369).

Les rétromères contrôlent la localisation de nombreuses protéines membranaires et sont impliqués dans les processus de développement tissulaire, en permettant par exemple, la mise en place d'un gradient Wnt (370), ou encore dans certaines pathologies telles qu'Alzheimer (371).

Rétromères et régulation des RCPG

Les travaux de Feinstein et ses collègues associent le complexe rétromère au trafic post-endocytaire des récepteurs PTHR et V2R, depuis les endosomes vers le réseau *trans*-golgien (353, 354). En utilisant le récepteur PTHR marqué avec une protéine fluorescente, ils montrent que l'arrêt de la signalisation AMPc dans les endosomes coïncide avec le découplage d'arrestine et le recrutement du complexe rétromère au récepteur (353). De manière intéressante, la co-localisation du rétromère avec le récepteur est diminuée lors de la surexpression du mutant β -arrestine-1-I386A/V387A, stabilisé dans une conformation active de haute affinité pour le récepteur, ce qui suggère que β -arrestine-1 et le rétromère sont en compétition pour interagir avec le récepteur. Cette hypothèse est supportée par des similarités de structures entre la protéine

du complexe rétromère VSP26 et les arrestines, ainsi que la présence d'un cœur polaire dans les deux protéines (372).

Dans une autre étude, la même équipe met en lumière l'importance des pompes à protons vacuolaires, qui participent à l'acidification de la lumière endosomale et à la dissociation du complexe récepteur/ligand (PTHR/PTH) dans l'arrêt de la signalisation intracellulaire du récepteur et la poursuite de son trafic vers les voies de recyclage. (359). Toutefois, il reste à définir si ces deux mécanismes agissent de manière indépendante ou coopérative et s'ils s'appliquent de manière universelle aux récepteurs présentant une activité endosomale des protéines G.

3.3. Régulation de l'activité signalétique des arrestines

3.3.1. Hypothèse du code-barres de phosphorylation des RCPG

Des études montrent que différentes GRK régulent différentes fonctions signalétiques des RCPG (373, 374). Par exemple, GRK2 et GRK3 permettent le recrutement d'arrestine et la désensibilisation des récepteurs V2R et AT1R alors que GRK5 et GRK6 sont indispensables à l'activation de ERK1/2 par arrestine. De la même manière, la phosphorylation de CXCR4 par GRK2, GRK6 et le recrutement de β -arrestine-1 jouent un rôle dans l'arrêt de la signalisation Gq et du signal calcique, alors que GRK3, GRK6 et β -arrestine-2 stimulent l'activation de la voie ERK/MAPK (375). Cette spécificité d'action des GRK peut être expliquée soit par la phosphorylation de substrats spécifiques (autres que le récepteur) par chacune de ces kinases, soit par la mise en place d'un patron de phosphorylation spécifique du récepteur qui modulerait en aval son activité et celle de l'arrestine.

En 2011, deux publications phares entérinent l'hypothèse d'un code-barres de phosphorylation pour les RCPG, utilisant comme modèle le récepteur β 2AR et le récepteur muscarinique à l'acétylcholine M3-mAChR (135, 376). Ainsi, le récepteur β 2AR présente de multiples patrons de phosphorylation induits par différentes GRK. Ces patrons sont associés à différentes fonctions cellulaires (376), alors que le récepteur M3-mAChR est différemment phosphorylé selon le type cellulaire ou le tissu, ce qui contrôle l'activation des voies de

signalisation physiologiquement pertinentes (135). Ces deux études mettent donc en évidence l'existence d'un code-barres de phosphorylation qui contrôle la spécificité d'activation des voies de signalisation en aval du récepteur, différents ligands pouvant alors potentiellement conduire à différents patrons de phosphorylation.

Une étude récente (377) utilisant une nouvelle technique d'incorporation d'acides aminés non-naturels, couplée à des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN), démontre la reconnaissance de ce code-barres de phosphorylation par le N-domaine des arrestines. Les auteurs décrivent dix sites potentiels de reconnaissance des résidus phosphorylés des RCPG au niveau du N-domaine qui, théoriquement, pourraient conduire à 1000 conformations différentes de la protéine arrestine engageant spécifiquement certaines voies de signalisation en aval.

3.3.2. Régulation d'arrestine par modifications post-transcriptionnelles

Nous avons déjà discuté dans la section 2.7.2 de la manière dont les différentes modifications post-transcriptionnelles des arrestines influent sur leur capacité à interagir avec les RCPG et à les internaliser. Dans cette partie, nous développerons plus spécifiquement l'impact de ces modifications post-transcriptionnelles sur la signalisation dépendante des arrestines.

Phosphorylation

Selon le modèle proposé par Lefkowitz et présenté dans la section 2.7.2, β -arrestine-1 est phosphorylée par ERK1/2 sur la Ser412 à l'état basal et sa déphosphorylation est requise pour permettre son interaction avec clathrine et donc l'internalisation du RCPG après stimulation par le ligand. Ce mécanisme de phosphorylation par ERK1/2 représente une boucle de rétrocontrôle de l'activation de cette kinase par le complexe récepteur/arrestine (267).

Une autre étude montre la phosphorylation du même résidu Ser412 par GRK5 après stimulation du récepteur sérotoninergique 5-HT₄R. Cette phosphorylation bloque aussi l'internalisation du récepteur 5-HT₄R et inhibe l'activation de c-Src/ERK (378).

Le résidu Tyr54, présent uniquement dans β -arrestine-1, est phosphorylé par c-Src, ce qui diminue l'interaction de β -arrestine-1 avec la sous-unité μ -adaptine d'AP-2. Selon les auteurs, cette phosphorylation représente un mécanisme spécifique contrôlant l'assemblage de complexes de signalisation contenant β -arrestine-1 (379).

Le mécanisme qui contrôle la déphosphorylation des arrestines n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, plusieurs études montrent l'interaction entre β -arrestine-2 et la phosphatase PP2A (339, 380) (voir section 3.1.4). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de PP2A conduit à une augmentation de la phosphorylation de β -arrestine-2 sur la Ser412 induite par l'insuline.

Ces différents travaux soulignent l'importance du cycle de phosphorylation et déphosphorylation des β -arrestines dans la régulation des voies de signalisation en aval.

Ubiquitination

Comme discuté précédemment (section 2.7.2), l'ubiquitination de β -arrestine-2 par Mdm2 est nécessaire à l'internalisation de β 2AR induite par l'agoniste. Cette ubiquitination stabilise aussi le signalosome récepteur/arrestine/ERK et permet sa translocation vers les endosomes, augmentant ainsi l'activation de la voie ERK/MAPK en réponse au ligand (269). Shenoy et Lefkowitz affinent ce résultat en démontrant que selon le RCPG activé, le patron d'ubiquitination de β -arrestine-2 est différent (135). Ils émettent l'hypothèse que la conformation active d'arrestine varie selon le récepteur auquel elle se lie, exposant ou non certains résidus Lys. Ceci pourrait expliquer les différents patrons d'ubiquitination observés et constituer un nouveau niveau de régulation de l'activité signalétique des β -arrestines.

En résumé, les arrestines sont au centre de la signalisation et de la régulation des RCPG. Les connaissances acquises ces vingt dernières années ont permis de mettre en lumière l'importance et la complexité des rôles non-canoniques des arrestines, grâce à des expériences *in vitro* et *in silico*, comme la cristallisation de complexes moléculaires permettant ensuite la

mise au point de modèles par homologie ; *in cellulo*, par microscopie ou à l'aide de différents biosenseurs ; et enfin *in vivo* dans des organismes modèles. L'action de ces protéines d'échafaudage est modulée par les différentes modifications post-traductionnelles qui lui sont apportées, mais aussi par les interactions qu'elles peuvent mettre en place avec différents effecteurs. Les outils et les techniques permettant l'étude de la signalisation non-canonique des arrestines est en constante évolution, et constitue un des axes d'étude des RCPG en pleine ébullition.

Objectifs de la thèse

L'avancée de nos connaissances dans le domaine de la signalisation des RCPG a permis de redéfinir les arrestines comme des interacteurs essentiels à la régulation mais aussi à la signalisation de ces récepteurs. Le rôle canonique des arrestines est de permettre la désensibilisation des RCPG et leur internalisation. Cependant, de plus en plus de rôles dits non-canoniques sont attribués aux arrestines, dont principalement l'activation de plusieurs voies de signalisation comme les voies MAPK, NF κ B ou encore Akt. L'objectif de ma thèse consiste à caractériser de nouveaux mécanismes non-canoniques de signalisation et de régulation des RCPG par les arrestines.

Depuis les débuts de la recherche sur les RCPG, plusieurs mécanismes de rétrocontrôle ont impliqué des kinases activées par le récepteur lui-même, comme les GRK ou PKA et PKC. Les travaux sur la signalisation dite non-canonique des arrestines montrent la capacité de ces protéines à stimuler la voie des ERK/MAPK, conduisant à une réponse physiologique différente de celle induite par les voies dépendantes des protéines G. Ces découvertes placent la kinase ERK1/2 au centre de la signalisation induite par les RCPG, toutefois l'effet d'un rétrocontrôle de ERK1/2 sur la signalisation des RCPG reste encore peu étudié. Le premier objectif de cette thèse est donc de déterminer l'effet d'une activation de la voie ERK/MAPK sur la signalisation des RCPG. Les objectifs spécifiques se divisent comme suit :

- 1) Examiner l'effet de l'activation de ERK1/2 sur l'expression de surface de CXCR4
- 2) Déterminer les conséquences de l'activation de ERK1/2 sur la signalisation de CXCR4
- 3) Valider la conservation du mécanisme de modulation de CXCR4 par ERK1/2 parmi d'autres RCPG
- 4) Établir le rôle des β -arrestines dans ce processus de régulation des RCPG dépendant de ERK1/2
- 5) Tester l'effet de l'activation de ERK1/2 sur la phosphorylation des β -arrestines
- 6) Valider le rôle de cette phosphorylation sur la régulation des RCPG induite par ERK1/2

Pour pouvoir étudier la signalisation des RCPG, nous disposons de plusieurs techniques et composés pharmacologiques qui permettent le suivi de l'activation de différents effecteurs en aval des récepteurs. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement à arrestine. Or, il n'existe aucun inhibiteur pharmacologique d'arrestine, et les approches génétiques qui sont généralement employées ne permettent pas d'inactivation aigüe de la fonction de cette protéine. Ainsi, le deuxième objectif de cette thèse est de développer un nouvel inhibiteur pharmacologique ciblant l'interaction arrestine/AP-2. Cet inhibiteur permettra une meilleure caractérisation du rôle de ce complexe dans la signalisation non-canonique des arrestines, tout en séparant les effets résultant du recrutement d'arrestine au récepteur de ceux provenant du complexe arrestine/AP-2. Les objectifs spécifiques se divisent comme suit :

- 1) Identifier des petites molécules organiques capables de moduler l'interaction β -arrestine-1/AP-2 par criblage virtuel
- 2) Sélectionner *in cellulo* un candidat via un essai de BRET mesurant l'interaction β -arrestine-1/AP-2, après activation du récepteur V2R
- 3) Valider la conservation de l'effet inhibiteur du composé sélectionné avec β -arrestine-2 et d'autres RCPG
- 4) Vérifier la sélectivité d'action du composé sélectionné
- 5) Valider l'effet inhibiteur du composé sur l'endocytose des récepteurs
- 6) Tester l'effet de l'inhibition de l'interaction β -arrestines/AP-2 sur la signalisation des RCPG

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la phosphatase PTEN, qui joue un rôle central dans la répression tumorale, et dont l'activation peut être régulée par arrestine. Toutefois, il n'existe aucun outil permettant de suivre aisément l'activation de cette protéine, et malgré l'implication d'arrestine dans sa régulation, aucune étude ne rapportait une modulation de l'activité de PTEN par les RCPG. Ainsi le troisième objectif de cette thèse est de développer un biosenseur basé sur la technique de BRET permettant de suivre l'activation de PTEN, avec comme objectifs spécifiques :

- 1) Valider l'activité phosphatase du biosenseur Rluc-PTEN-YFP

- 2) Vérifier la capacité du biosenseur à retranscrire des changements conformationnels de PTEN après mutagenèse dirigée ou activation physiologique
- 3) Valider l'interaction du biosenseur avec des interacteurs/activateurs connus : RhoA et β -arrestine-2
- 4) Tester la capacité de différents RCPG à réguler l'activation de PTEN

Résultats

Article 1

Receptor sequestration in response to β -arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression

Justine S. Paradis, Stevenson Ly, Élodie Blondel-Tepaz, Jacob A. Galan, Alexandre Beautrait, Mark G. H. Scott, Hervé Enslin, Stefano Marullo, Philippe P. Roux, et Michel Bouvier.

Publié dans *PNAS*, le 15 septembre 2015

Résumé

Les MAPK sont activées en réponse à la stimulation des RCPG par leurs ligands, et jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires en aval de ces récepteurs. Cependant, l'effet de l'activation des MAPK sur l'activité des RCPG est très peu connu. Afin d'étudier un possible mécanisme de régulation croisée entre MAPK et RCPG, nous avons évalué l'effet de l'activation de ERK1/2 sur l'activité de plusieurs récepteurs. Nous avons montré que l'activation de ERK1/2 entraîne l'internalisation, et donc la diminution de l'expression basale de surface, de plusieurs RCPG. Cette redistribution subcellulaire des récepteurs conduit à une diminution de la capacité de réponse de la cellule, qui se traduit par une baisse de l'activation des protéines G et de la production de messagers secondaires, ainsi qu'une diminution du recrutement des GRK et d'arrestine, lors de l'activation d'un récepteur.

Cette régulation, dépendante de ERK1/2, est conservée parmi les RCPG capables d'interagir avec arrestine, dont : le récepteur à la vasopressine de type-2, à l'angiotensine de type-1, et aux chimiokines CXC de type-4, mais pas le récepteur à la prostaglandine F, qui lui n'interagit pas avec arrestine. Ces résultats suggèrent une implication directe de la protéine d'échafaudage arrestine dans ce processus de redistribution cellulaire des récepteurs. Les expériences de complémentation dans des fibroblastes d'embryon de souris (MEF) n'exprimant

plus β -arrestine-1/2, combinées à des essais de phosphorylation *in vitro*, montrent que la phosphorylation de β -arrestine-2 par ERK1/2 sur les résidus Ser14 et Thr276 est essentielle à la séquestration des RCPG. Ce nouveau mécanisme de régulation a été observé à la suite d'une phosphorylation constitutive de ERK1/2, ainsi que d'une activation via les récepteurs tyrosines kinases ou les RCPG. Ces résultats placent ERK1/2 au centre de la régulation tonique de la capacité de réponse de la cellule, en agissant à la fois comme effecteurs et comme régulateurs négatifs.

Contributions : j'ai conçu l'ensemble des expériences qui ont ensuite été réalisées par moi-même, ou par un étudiant de 1^{er} ou de 2^{ème} cycle sous ma supervision (Stevenson Ly et Élodie Bondel-Tepaz). Seuls les échantillons de protéines pour la spectrométrie de masse ont été traités par Jacob Galan. J'ai écrit le manuscrit sous la supervision de mes directeurs de thèse et procédé à l'ensemble des révisions.

Receptor sequestration in response to β arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell surface expression

Short Title: ERK1/2-dependent regulation of GPCR trafficking

Justine S. Paradis^a, Stevenson Ly^a, Élodie Blondel-Tepaz^a, Jacob A. Galan^{a,1}, Alexandre Beaudrait^a, Mark G. H. Scott^b, Hervé Enslin^b, Stefano Marullo^b, Philippe P. Roux^{a,2}, Michel Bouvier^{a,2}

^a *Institute for Research in Immunology and Cancer, Molecular Biology Program, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Montréal (QC), H3C 3J7, Canada.*

^b *Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75005 Paris, France.*

¹ *Current address: Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114, USA*

² *Co-corresponding authors: Michel Bouvier (E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca) and Philippe P. Roux (E-mail: philippe.roux@umontreal.ca)*

Keywords: β -arrestin, MAPK, G protein-coupled receptor, internalization, cell signaling

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are activated in response to G protein-coupled receptors (GPCRs) stimulation and play essential roles in regulating cellular processes downstream of these receptors. However, very little is known on the reciprocal effect of MAPK activation on GPCRs. To investigate possible crosstalk between the MAPK and GPCRs, we assessed the effect of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) on the activity of several GPCR family members. We found that ERK1/2 activation leads to a reduction in the steady-state cell surface expression of many GPCRs as a result of their intracellular sequestration. This subcellular redistribution resulted in a global dampening of cell responsiveness, as illustrated by reduced ligand-mediated G protein activation and second messenger generation as well as blunted GPCR kinases (GRK) and β arrestin recruitment. This ERK1/2-mediated regulatory process was observed for GPCRs that can interact with β arrestins, such as type-2 vasopressin, type-1 angiotensin, and CXCR type-4 chemokine receptors, but not the prostaglandin F receptor that cannot interact with β arrestin, implicating this scaffolding protein in the receptors' subcellular redistribution. Complementation experiments in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking β arrestins combined with *in vitro* kinase assays revealed that β arrestin-2 phosphorylation on Ser14 and Thr276 is essential for the ERK1/2-promoted GPCR sequestration. This novel regulatory mechanism was observed following constitutive activation as well as receptor tyrosine kinase- or GPCR-mediated activation of ERK1/2, suggesting that it is a central node in the tonic regulation of cell responsiveness to GPCR stimulation, acting both as an effector and a negative regulator.

Significance Statement

ERK1/2 are important GPCR signaling effectors but their role as possible regulators of GPCRs remains largely uncharted. We report that ERK1/2 activation leads to the phosphorylation of β arrestin-2 on Ser14 and Thr276, promoting the intracellular sequestration of unliganded GPCRs. This subcellular redistribution results in the dampening of cell responsiveness to GPCRs ligand-mediated activation, positioning ERK1/2 as both a downstream effector and a negative regulator of GPCRs. Given that ERK1/2 is also stimulated by receptor tyrosine kinases and is found to be deregulated in many diseases, and that GPCRs respond to a large number of hormones and neurotransmitters, this newly uncovered regulatory process is poised to play a central role in controlling cell responsiveness in health and disease.

Introduction

The extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [1, 2] has been traditionally linked to the activation of receptor tyrosine kinases (RTKs) [3, 4], but in recent years, G protein-coupled receptor (GPCR)-mediated ERK/MAPK activation has also been shown to play important roles [5]. Such convergence on the Raf/MEK/ERK signaling module generates multiple opportunities for crosstalk regulation between GPCR and RTK signaling and many distinct molecular mechanisms have been described [6]. GPCRs activate the ERK/MAPK pathway via both G protein-dependent (canonical) and -independent (non-canonical) pathways. The canonical pathway can involve diverse G α and/or G $\beta\gamma$ subunits that cause ERK1/2 activation through various downstream effectors, such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), exchange protein directly activated by cAMP (EPAC), as well as protein kinase A and C (PKA and PKC) [7-11]. Among the non-canonical mechanisms, engagement of β arrestins (β arrest) scaffolding the Raf/MEK/ERK module has attracted considerable attention [12-14]. For both canonical [15] and non-canonical [16, 17] pathways, transactivation of RTKs downstream of some GPCRs has also been shown to contribute to ERK1/2 regulation. Particularly, direct recruitment of β arrest to several RTKs [18], including the insulin-like growth factor receptor (IGFR) [19, 20], the insulin receptor (IR) [21] and the epidermal growth factor receptor (EGFR) [22-24] following activation of either the RTK or a GPCR also results in ERK1/2 activation, emphasizing the central role of β arrest in controlling ERK1/2 activity.

When considering the classical G protein-mediated signaling, several processes controlling the duration of the signal have been elucidated including both homologous and heterologous desensitizations. The former involves phosphorylation of the activated receptor by GPCR kinases (GRKs) leading to the high-affinity binding of β arrest to the activated receptor, uncoupling of the receptor from G proteins and subsequent internalization [25-27]. Heterologous desensitization occurs upon activation of second messenger-dependent kinases, such as PKA or PKC, and may or may not be followed by receptor internalization [28, 29]. Despite the fact that, as mentioned above, ERK1/2 activation has now been recognized as a main signaling module in both G protein- and β arrest-dependent pathways, very little is known on the possible adaptive mechanisms resulting from the activation of these kinases. In one study [30],

phosphorylation of β arr1, but not β arr2, by ERK1/2 was proposed to inhibit the agonist-promoted translocation of β arr1 to the β 2-adrenergic receptor (β 2AR) preventing its endocytosis. More recently, ERK1/2-promoted phosphorylation of rat β arr2 was shown to stabilize the complex between the B2-bradykinin receptor (B2R) and β arr2, thereby slowing down the recycling of the receptor to the plasma membrane following agonist-promoted endocytosis [31]. Although these data point to possible feedback roles of the ERK/MAPK pathway on receptor trafficking, they also raise important questions on the general role that ERK1/2 activation may play on GPCR activity.

Here we investigated the influence of ERK1/2 activation on GPCR responsiveness using the chemokine CXC type-4 receptor (CXCR4) as a model. We found that activation of the ERK/MAPK pathway results in decreased CXCR4 signaling upon stimulation by its native agonist, CXCL12. This reduced responsiveness resulted from the direct phosphorylation of β arr2 by ERK1/2 on two Ser/Thr residues, ultimately leading to the constitutive intracellular redistribution of the receptor. This previously unidentified regulatory mechanism is not restricted to CXCR4 and is shared by other GPCRs that are able to interact with β arrs. Our study therefore unravels an adaptive mechanism leading to a general dampening of cell responsiveness to GPCR stimulation in response to the activation of the ERK/MAPK by either RTKs or GPCRs.

Results

Activation of the ERK/MAPK pathway decreases CXCR4 agonist-induced Gi activation.

Gi protein activation downstream of agonist (CXCL12) stimulation of CXCR4 was examined in the presence or absence of upstream modulators of the ERK/MAPK pathway. G protein activation was monitored using a BRET400-GFP10-based assay that detects the agonist-promoted separation of $G\alpha_{i1}$ and $G\gamma_2$ in intact cells (Fig. 1A) [32]. CXCL12 induces a rapid decrease in BRET signal between $G\alpha_{i1}$ -91RlucII and GFP10- $G\gamma_2$ in cells coexpressing the unmodified CXCR4 and $G\beta_1$ (Fig. S1A). Constitutively-active (CA) forms of H-Ras and MEK1 (Ras-CA [Ras-G12V] or MEK-CA [MEK-S218/222D]), which promote ERK1/2 activation [33], diminished CXCL12-induced activation of Gi compared to cells expressing an empty vector or the dominant-negative (DN) forms of H-Ras and MEK1 (Ras-DN [Ras-S17N] or MEK-DN [MEK-K97A]) (Fig. 1B,C). The effect of modulating the ERK/MAPK pathway was then examined on CXCL12-evoked calcium response using the Obelin biosensor [34] as a calcium reporter in HEK293T cells endogenously expressing low level of CXCR4 (Fig. 1D and Fig. S1B). The expression of both Ras-CA and MEK-CA reduced CXCL12-induced calcium mobilization, whereas Ras-DN did not (Fig. 1E,F). In contrast, calcium mobilization triggered by the calcium ionophore A23187 was unaffected by modulation of the ERK/MAPK pathway (Fig. 1E,F), indicating that CXCR4-dependent signaling is selectively reduced by activated ERK1/2. Given that CXCR4-mediated calcium mobilization is a Gi-dependent response [35, 36], these findings demonstrate that activation of the ERK/MAPK pathway significantly reduces Gi activation and downstream calcium signaling upon CXCR4 stimulation. The larger reduction in the calcium response compared to the Gi activation signal most likely reflects the different assay modes (i.e., greater number of spare receptors in the BRET-based Gi activation assay that requires exogenous CXCR4 co-expression).

Activation of the ERK/MAPK pathway decreases agonist-induced GRK2 and β arrestin-2 translocation.

To further investigate the effect of ERK1/2 activation on CXCR4 signaling, we assessed CXCL12 promoted GRK2 and β arr2 translocation by BRET using CXCR4-RLucII and either GRK2-GFP10 or β arr2-GFP10 constructs (Fig. 1G,J and Fig. S1C,D). Coexpression of Ras-CA

and MEK-CA, but not Ras-DN and MEK-DN, decreased the translocation of GRK2 and β arr2 following CXCR4 stimulation (Fig. 1H,I,K,L). Thus, in addition to blunting Gi responses, activation of the ERK/MAPK pathway greatly reduces GRK2 and β arr2 translocation.

ERK1/2 activation decreases CXCR4 localization at the cell surface.

The decrease in Gi activation and the reduced translocation of GRK2 and β arr2 could either result from a general loss of the receptor's ability to productively respond to CXCL12 or from reduced receptor number at the cell surface. To directly test the latter possibility, we assessed the effect of stimulating the ERK/MAPK pathway on CXCR4 cell surface expression by dual flow cytometry (dual FACS). This approach allows the measurement of cell surface receptor density (reflected by HA immunoreactivity) as a function of total receptor number (reflected by the vYFP fluorescence) in unpermeabilized HEK293T cells stably expressing HA-CXCR4-vYFP (Fig. 2A). Using this system, we found that Ras-CA and MEK-CA, but not Ras-DN and MEK-DN, led to a 70% reduction in the number of CXCR4 at the cell surface (Fig. 2B,C).

To further validate these findings, we imaged the distribution of CXCR4-YFP by confocal fluorescence microscopy in HeLa cells. As shown in Fig. 3A, in the absence of ERK/MAPK activation, CXCR4 is mainly localized at the cell surface. Expression of either Ras-CA (Fig. 3B) or MEK-CA (Fig. 3D) resulted in a substantial loss of cell surface receptors and the appearance of a punctate intracellular fluorescence signal, indicating that activation of the ERK/MAPK pathway triggers the redistribution of CXCR4 to intracellular vesicles. The DN forms of Ras and MEK were without effect on CXCR4 distribution (Fig. 3C,E). Semi-quantification of the receptor redistribution using the ImageJ software [37] was performed by selecting transversal sections of the cells that allow definition of the plasma membrane and intracellular compartment (Fig. 3, YFP intensity plot, right panels). These data (Fig. S2) support the FACS results demonstrating that activation of the ERK/MAPK pathway promotes a significant subcellular redistribution of CXCR4 from the cell surface to the intracellular compartment.

Acute stimulation of the ERK/MAPK pathway results in CXCR4 intracellular sequestration and blunted signaling

Next, we evaluated the effects of pharmacological and endogenous agonists of the ERK/MAPK pathway [38, 39] on the subcellular distribution and signaling capacity of CXCR4. Acute stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or epidermal growth factor (EGF) resulted in a weaker CXCL12-promoted recruitment of β arr2 (Fig. 4A) and a $\approx 20\%$ reduction in the proportion of cell surface receptors in the absence of agonist stimulation (Fig. 4B). Interestingly, the kinetics of surface receptor loss paralleled that of ERK1/2 activation, both peaking at 15 min and being transient for EGF while peaking at 30 min and being sustained for PMA stimulation (Fig. 4C). Stimulation of the vasopressin type-2 receptor (V2R, a GPCR known to strongly activate ERK1/2 [40]) was also found to induce CXCR4 sequestration to the same extent as EGF and PMA stimulation (Fig. 4D). In all cases, inhibition of ERK1/2 activation with the selective MEK1/2 inhibitor, PD184352 [41], restored the initial proportion of cell surface CXCR4 confirming that ERK1/2 activation is functionally correlated with the loss of cell surface receptor. The effect of EGF stimulation on cell surface receptor was also tested in the T-lymphoid cell line SUP-T1 that endogenously expresses CXCR4 (Fig. 4E). Indeed, FACS analysis using a monoclonal antibody directed against the extracellular domain of the human CXCR4 showed a significant EGF-evoked loss of cell surface CXCR4, indicating that this modulation is also observed with endogenous receptors. Taken together, these data indicate that both acute and sustained stimulation of the ERK1/2 signaling pathway promote CXCR4 redistribution but that, as could be expected, long-lasting activation results in more dramatic effects reaching as much as 70% in the 48 hours following the expression of constitutively active mutants of Ras and MEK.

The ERK/MAPK pathway negatively modulates several GPCRs

Our results indicate that cell surface CXCR4 density is negatively regulated upon activation of ERK1/2 by several agonists and in different cell types. To determine whether this regulatory mechanism can be generalized to other GPCRs, we assessed the effect of MEK-CA on three additional GPCRs, the vasopressin (V2R), the angiotensin (AT1R) and the prostaglandin (FP) receptors. For this, we monitored G protein-mediated signaling, GRK2 and β arr2 recruitment, as well as cell surface density. As shown in Fig. 5A,B, we found that expression of MEK-CA, but not MEK-DN, led to a reduction in V2R and AT1R surface density. This loss of cell surface receptor (60 % for the V2R and 80% for the AT1R), resulted in diminished agonist-promoted

recruitment of GRK2 and β arr2, as well as a blunted signaling response (cAMP production for V2R and Ca^{2+} mobilization for AT1R). The extent of signal reduction differed between the two receptors probably reflecting distinct levels of coupling efficiency and spare receptors for the signaling pathways considered. No such negative regulation was observed for the FP receptor (Fig. 5C left and right panels), indicating that only certain GPCRs are negatively regulated by ERK1/2. Interestingly, unlike CXCR4, V2R and AT1R, the agonist stimulation of the FP receptor does not promote β arr2 translocation to the receptor [42] (Fig. 5C, middle panel), suggesting that the ERK1/2-dependent regulatory process may involve β arr2.

β arrestin is required for the ERK1/2-dependent cellular redistribution of GPCRs.

To confirm the role of β arr2 in the subcellular redistribution of CXCR4 in response to ERK1/2 activation, we analyzed CXCR4 cell surface expression in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from wild-type (WT) and β arr1/2 knockout (KO) animals [43]. Consistent with our observations in HEK293T, HeLa and SupT1 cells, we found that activation of ERK1/2 led to a significant decrease in the proportion of CXCR4 at the cell surface in WT MEFs (Fig. 6A). Notably, this modulation was completely lost in β arr1/2 KO MEFs cells (Fig. 6A). Re-introducing β arr2 or β arr1 (Fig. 6B) in β arr1/2 KO MEFs by transfection restored ERK1/2-promoted loss of cell surface CXCR4 yielding to sequestration of $30 \pm 3\%$ and $38 \pm 4\%$, respectively, compared to $52 \pm 4\%$ for the WT MEFs. Co-expression of both β arr1 and β arr2 did not lead to a statistically significant greater loss of receptors, reaching $42 \pm 5\%$ indicating that both β arr1 and β arr2 can promote receptor redistribution following ERK1/2 activation. Similarly to what was observed in other cell types, expression of Ras-DN did not affect CXCR4 cell surface density in β arr1/2 KO MEFs whether β arr2 was reintroduced or not (Fig. 6C), confirming the selectivity of action of active Ras.

β arrestin phosphorylation is required for ERK/MAPK-induced CXCR4 redistribution.

To determine if CXCR4 subcellular redistribution results from the direct phosphorylation of β arr2 by ERK1/2, we first tested if activated ERK1 could phosphorylate purified β arr2 and β arr1 *in vitro*. As shown in Fig. 6D, ERK1 induced a robust incorporation of [^{32}P] in both β arr1 and β arr2, with β arr2 appearing to be a better substrate. Quantification of ^{32}P incorporation revealed

saturatable phosphorylation with stoichiometry approaching 2 mol/mol for β arr1 and 2.5 for β arr2, consistent with the presence of at least two phosphorylation sites. We then analyzed phospho- β arr2 by mass spectrometry (MS) to identify the ERK1 phosphorylation sites. MS/MS sequencing revealed the presence of β arr2-derived phosphopeptides containing Thr276 (Fig. S3A). This position corresponds to one of the potential ERK1/2 consensus sites (Ser/Thr-Pro) [44] in β arr2 (Ser14, Ser264 and Thr276) (Fig. S3B). Unphosphorylated peptides containing the other potential sites were detected at much lower abundance, but Ser14 was previously identified as being phosphorylated in Jurkat cells [45]. It should be noted that all putative sites are evolutionarily conserved in β arr2 (Fig. S3C), but only Ser14 and Thr276 are found in both β arr1 and β arr2 (Fig. S3D), underscoring the likelihood of their importance for β arr function. As shown in Fig. S3B, *in silico* analysis of residues accessibility using molecular modeling of β arr2 from its crystal structure (PDB: 3P2D) with the Molecular Operating Environment software (MOE) [46], suggests that in the basal inactivated state, Thr276 is exposed to the solvent and consequently could be easily accessible to protein kinases. In contrast, Ser14 is buried in the core of the protein and would probably require molecular environment reorganization in order to be phosphorylated.

To determine the role of β arr2 phosphorylation in ERK1/2-dependent GPCR regulation, Ser14, Ser264 and Thr276 were individually replaced by unphosphorylatable alanine residues (S14A, S264A, T276A). These β arr2 mutants were then tested for their ability to restore CXCR4 modulation upon ERK1/2 activation in β arr1/2 KO cells. As shown in Fig 6E, in contrast to β arr2-WT or β arr2-S264A, the expression of β arr2-S14A or β arr2-T276A failed to restore any significant ERK1/2-promoted CXCR4 sequestration, suggesting a role for the phosphorylation of both residues in this mechanism. These results are further supported by the observation that expression of a mutant form of β arr2 harboring phosphomimetic residues at positions Ser14 and Thr276 (S14D/T276D; S/T2D) was sufficient to decrease CXCR4 cell surface localization in the absence of activation (Fig. 6F). Both S14A/T267A (S/T2A) and S14D/T267D (S/T2D) β arr2 mutant forms maintained their ability to be recruited to CXCR4 upon receptor activation by its natural ligand CXCL12 (Fig. S4), confirming their functionality. Together, these results suggest that β arr2 phosphorylation at Ser14 and Thr276 via an ERK1/2-dependent mechanism promotes CXCR4 redistribution thus dampening GPCR signaling.

Discussion

Our data demonstrate that ERK1/2 activation leads to the sequestration of GPCRs into intracellular vesicles, which functionally results in the loss of cell responsiveness to GPCR stimulation. This phenomenon appears to be conserved amongst a subclass of GPCRs that recruits β arr2 in response to agonist-activation. Indeed, our results show that ERK1/2 activation also affects the distribution of V2R and AT1R [43], but not FP, which undergoes endocytosis in a β arr-independent manner [42]. Consistently, we found that receptor redistribution requires the phosphorylation of β arr2 by ERK1/2, unraveling an uncharacterized molecular mechanism for crosstalk between ERK1/2 and GPCR signaling.

The ERK1/2-dependent intracellular redistribution of GPCRs was observed in response to constitutive activation of the MAPK pathway (by active forms of MEK1 and H-Ras), stimulation of ERK1/2-activating GPCRs (V2R) or RTKs (EGFR) or pharmacological activation of the ERK/MAPK pathway (PMA). Receptor sequestration resulted in a loss of cell responsiveness to GPCR agonists, as assessed by G-protein activation, second messenger generation as well as GRK and β arr recruitment. This phenomenon represents a heterologous desensitization process that had not been appreciated until now. Given that many GPCRs activate ERK1/2, it could be hypothesized that this mechanism also contributes to the homologous desensitization of such receptors.

PKC activation with different phorbol esters, including PMA, has previously been shown to promote the endocytosis of several GPCRs, including CXCR4 [47-49]. These results have been attributed to a potential PKC-mediated phosphorylation of the receptor itself, but a direct link between receptor phosphorylation and its PMA-induced endocytosis has not been established. Our data demonstrate that PMA-stimulated CXCR4 endocytosis requires ERK1/2 activation, suggesting that the mechanism elucidated in the present study may explain the effect of PMA on the endocytosis of many GPCRs.

The ERK1/2-induced sequestration of GPCRs into cytoplasmic vesicles could either result from accelerated constitutive endocytosis or reduced recycling from endosomes to the plasma membrane. Given the classical role of β arr in the endocytosis process, the first possibility appears more likely. This idea is supported by the observation that ERK1/2 activation led to the

sequestration of V2R, a receptor that does not undergo significant recycling following endocytosis [50]. Whether the modulation of constitutive endocytosis results from an increased affinity of ERK1/2-phosphorylated β arrs for unliganded receptors or for other proteins involved in the endocytic process remains to be determined. Interestingly, one of the putative ERK1/2 phosphorylation sites identified in β arr2 (Ser14) is located in close proximity to two lysine residues (K11 and 12). These lysines bind the phosphate moieties of the phosphorylated receptors and can facilitate the transition to the high affinity receptor- β arrestin binding state [51]. It could therefore be hypothesized that the phosphorylation of Ser14 may mimic the phosphorylated receptor thus promoting a high-affinity interaction with an inactive, non-phosphorylated receptor.

The causal link between ERK1/2 activation and steady-state receptor redistribution is supported by the complete inhibition of the PMA- and EGF-induced CXCR4 sequestration by the MEK1/2 inhibitor PD184352. Moreover, the kinetics of CXCR4 redistribution paralleled those of ERK1/2 activation with both ERK1/2 activation and receptor sequestration being sustained for PMA but transient for EGF stimulation. The rescue experiments using non-phosphorylatable forms of human β arr2 or β arr2 harboring phosphomimetic residues further establishes the link between β arr2 phosphorylation and receptor sequestration. The lack of redistribution of FP, a receptor that cannot recruit β arr2, is also consistent with the central role of β arr2 in ERK1/2-promoted receptor relocalization.

Our results suggest the involvement of two putative ERK1/2 phosphorylation sites in β arr2, Ser14 and Thr276, since their mutation to alanine residues blocked ERK1/2-promoted CXCR4 sequestration, whereas their substitution to phosphomimetic aspartate residues mimicked the effect of ERK1/2 activation. One of these sites, Thr276, was confirmed as a direct ERK1 phosphorylation site by our MS/MS analysis, whereas Ser14 has been previously shown to be phosphorylated in a large-scale phosphoproteomic study [45], thus supporting the notion that ERK1/2 phosphorylates β arr2 on these two residues. Although these phosphorylation sites are conserved in β arr1, whether or not β arr1 phosphorylation on these sites also contributes to receptor redistribution remains to be directly demonstrated. Using two-dimensional tryptic phosphopeptide mapping, a previous study identified another serine residue (Ser412) as a direct ERK1/2 phosphorylation site in rat β arr1 [30]. However, since Ser412 is not conserved in either

rat or human β arr2, it is unlikely that this site plays any major role in the mechanisms described here. More recently, Ser178 was proposed as a phosphorylation site for ERK1/2 in rat β arr2 and was found to modulate the dynamics of β arr2 within the endosomal compartment [31]. However, this mechanism is distinct from the one we describe as rat Ser178 is not conserved in human β arr2.

In the present study, we identified two novel phosphorylation sites for ERK1/2 in β arr2 that play a key role in regulating steady state cell surface expression of different GPCRs. Given the large proportion of GPCRs that interact with β arrs, the observed receptor sequestration promoted by the ERK1/2-mediated phosphorylation of β arr could have a major impact on the tonic regulation of cell responsiveness to a variety of hormonal stimulations. Since ERK1/2 activation is known to be deregulated in many pathological diseases, including several cancers, this mechanism could have far reaching consequences on our understanding of different pathophysiological processes.

Materials and Methods

Plasmids. The following plasmids were previously described: flag-MEK1-S218/222D [52], G β 1, GFP10-G γ 2 [53], CXCR4-RlucII [54], CXCR4-YFP [55], Obelin-Cherry [56], Gai1-91RlucII, HA-CXCR4 and HA-CXCR4-vYFP [36], GFP10-EPAC-RLucII, HA-AT1R [57], HA-FP [58], HA-V2R [59]. Ha-FP-vYFP and FP-RLucII were provided by Terrence Hébert (McGill University). The β arr2-GFP10 construct was built by replacing the RLucII sequence from the previously published β arr2-RlucII [36]. vYFP was introduced into pIRES-PHA to generate the pIRES-PHA-vYFP vector. PAFR, V2R or spAT1R (sp, signal peptide MKTIIALSYIFCLVFA at the N-terminus) sequence was introduced into pIRES-PHA-vYFP to generate pIRES-PHA-PAFR-vYFP, pIRES-PHA-V2R-vYFP or pIRES-PHA-AT1R-vYFP. The human β arr1 and β arr2 cDNA were obtained from cDNA Resource Center (Rolla, MO) and cloned in pCMV-Tag3B (Stratagene) to obtain myc-tagged proteins, while H-Ras and MEK1 cDNA were cloned in pCMV-Tag2A (Stratagene) to obtain flag-tagged proteins. All mutants (β arr2-S14A, -T126A, -S264A, -S/T2D; H-Ras-G12V, -S17N] and MEK1-K97A) were generated using the QuikChange (Stratagene) methodology and verified by sequencing.

Reagents and antibodies. CXCL12 was purchased from Cedarlane (Burlington, ON). AVP, PGF₂ and AngII were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). A23187 was purchased from Tocris (Bristol, UK). MEK1/2 inhibitor, PD184352, was purchased from Selleck Chemicals (Boston, MA). ERK1/2 activators, EGF and PMA, were purchased from Invitrogen (Carlsbad, NM) and Fisher Scientific (Waltham, MA), respectively. Anti-ERK1/2, -phospho-ERK1/2 (T202/Y204), and - β arr1/2 antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Anti-myc and -Flag, antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-human CXCR4 antibody was purchased from BioLegend (San Diego, Ca). Anti-HA antibody (HA-11) was purchased from Covance (Princeton, NJ). Anti-mouse Alexa Fluor 647 secondary antibody was purchased from Invitrogen (Carlsbad, NM). All secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies used for immunoblotting were purchased from Chemicon (Temecula, CA).

Cell Culture. Human Embryonic Kidney 293T (HEK293T), HeLa, Mouse Embryonic Fibroblasts β arr1-KO/ β arr2-KO (β arr1/2 KO MEFs) and wild-type (WT MEFs) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 100 I.U./mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin. β arr1/2 KO mice were generated as described [43] and established mouse embryonic fibroblasts (MEFs) cultures were prepared according to the 3T3 protocol of Todaro and Green [60]. For HEK293T HA-CXCR4-vYFP stable cell lines, YFP positive polyclonal cell population was obtained by flow cytometry cell sorting and maintained in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 100 I.U./mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 3 μ g/mL puromycin. Sup-T1 were cultured in RPMI-1640 Medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 100 I.U./mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin.

Transfections. The day before transfections, HEK293T or HEK293T HA-CXCR4-vYFP cells were seeded in 6-well plates at a density of 600,000 cells/well. Transient transfections were performed using linear polyethyleimine 25 kDa (PEI, Polysciences, Inc.) as transfection agent, at a ratio of 3:1 PEI:DNA. Cells were maintained in culture for the next 48 h, and BRET experiments subsequently carried out. For the transfection of MEFs, cells were seeded in 6-well plates at a density of 600,000 cells/well the day before and transiently transfected using FuGENE HD (Promega), at a ratio of 3:1 FuGENE HD:DNA. Cells were maintained in culture for the next 24 h and FACS experiments subsequently carried out.

Bioluminescence Resonance Energy Transfer assays. BRET assays were performed as described previously [36, 61]. For BRET480-YFP, proteins were fused to RLuc as energy donor and YFP as acceptor. Coelenterazine-h (coel-h, NanoLight Technology) was used as the luciferase substrate to generate light with a maximal emission peak at 480 nm, allowing YFP excitation (maximum at 488nm). For BRET400-GFP10, proteins were fused to RLucII (donor) and GFP10 (acceptor). Coelenterazine-400a (coel-400a, Biotium) was used as the luciferase substrate to generate light with a maximal emission peak at 400 nm, allowing GFP10 excitation (maximum at 400nm). BRET was measured using a Mithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) equipped with either BRET480-YFP filter set (donor 480 ± 20 nm and acceptor 530 ± 20 nm filters) or BRET400-GFP10 filter set (donor 400 ± 70 nm and acceptor 515 ± 20 nm filters). Briefly, cells were seeded the day after transfection in a Poly-L-

ornithine (Sigma-Aldrich) pretreated 96-well microplate (CulturePlate, PerkinElmer Inc.) and starved overnight in DMEM at least 8 hours after seeding. The day of the experiment, cells were incubated with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen) complemented with 0.1% BSA (HBSS/BSA) and stimulated with ligands (CXCL12: 200 nM, AVP: 100 nM, AngII: 1 μ M, PGF-2: 1 μ M) for 15 min. Where indicated, cells were pretreated with PD184352 (10 μ M) for 30 min prior to stimulation with EGF (25 ng/ml) for 15 min or PMA (100 ng/ml) for 30 min (maximal response) or for the indicated times (time course). BRET values were collected following the addition of the luciferase substrate at a final concentration of 2.5 μ M. BRET signals were determined as the ratio of the light emitted by acceptor (YFP or GFP10) over donor (RLuc or RlucII). The ligand-promoted BRET signal (Δ BRET) was calculated by subtracting the BRET values obtained in the vehicle condition from the ones measured with ligand. Δ BRET was expressed as a percentage of the Δ BRET obtained in the control condition in which the ERK/MAPK pathway was not modulated neither by a mutant or a treatment.

Calcium Measurements. HEK293T were transiently transfected with Obelin-Cherry used as a calcium reporter [34]. The day after transfection, cells were seeded in a Poly-L-ornithine pretreated 96-well microplate in order to obtain duplicate plates for ligand or ionophore stimulation. The day of the experiment, cells were washed with HBSS and incubated for 2 h in the dark, at room temperature, with 1 μ M coelenterazine cp (Biotium) diluted in HBSS/BSA. Luminescence measurements were recorded for 60 s on a FlexStation II (Molecular Devices) after ligand injection (CXCL12: 200 nM, A23187: 10 μ M, AngII: 1 μ M, PGF-2: 1 μ M). Kinetics were normalized, setting the maximal response of the ligand at 100%. Bar graphs were generated from the area under the curve of each kinetic.

Flow Cytometry. Briefly, 48 h after transfection, HEK293T HA-CXCR4-vYFP cells were starved overnight in DMEM. Where indicated, cells were pretreated with PD184352 prior to EGF or PMA stimulation. They were then rinsed with ice-cold HBSS and resuspended in HBSS/BSA. Cell surface receptors were labeled on ice using a monoclonal anti-HA antibody followed by an anti-mouse Alexa Fluor 647 secondary antibody. SUP-T1 cells were starved overnight and then stimulated with EGF for 15 min, rinsed with ice-cold HBSS, resuspended in HBSS containing Fc block solution 24G2 (anti-CD16/32-FcR γ), and stained using an anti-

human CXCR4 antibody (PerCP/Cy5.5 anti-human CD184 clone 12G5; BioLegend) for 45 min on ice. Cells were washed, resuspended and analyzed through a LSR II flow cytometer (BD Biosciences) set to detect YFP and Alexa Fluor 647 or PerCP/Cy5.5. Data analysis was performed using BD FACSDiva software.

Image acquisition and analysis. Briefly, HeLa cells were transfected and then seeded into a μ -Dish (IBIDI, #81156). Two days after transfection, epifluorescence confocal microscopy images from single confocal sections (0.7 μ m) were acquired at room temperature with an LSM 510 Meta laser scanning confocal microscope (Zeiss) using a Plan Apochromat 100 \times oil-immersion objective. All images were acquired using identical parameters. The co-localization between the membrane and the YFP signal was determined using ImageJ software (NIH). First, a line crossing a YFP positive cell was drawn on the phase contrast image and the coordinates of the plasma membrane and the intracellular compartments were determined from the grey intensity profile along this line. The same line was then transposed to the YFP image and mean fluorescence intensity profiles along this line were obtained. Using the coordinates of the plasma membrane and the intracellular compartment, total YFP intensities were calculated and both the plasma membrane and inner cell intensities were expressed as a percentage of total intensity along the section in each condition

***In vitro* phosphorylation assays.** Phosphorylation assays were performed *in vitro* with recombinant bovine α arr1 or α arr2 (gift of Stéphane Laporte, McGill University) as a substrate (3 μ g per assay) and recombinant active ERK1 (100 ng per assay, Millipore #14-439). The reaction products were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and 32 P incorporation was quantified using a Bio-Rad phosphorImager and Multi-Gauge software. To calculate the phosphate to substrate ratio, [32 P] incorporation in β arr1 or β arr2 was measured using a scintillation counter and normalized to the specific activity of [32 P]ATP in the reaction.

Immunoblotting. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE on 10% acrylamide gels and electroblotted to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Blocking, primary and secondary antibody incubations of immunoblots were performed in TBST (10 mM Tris, pH 7.4,

150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) supplemented with 5% (wt/vol) dry skim milk powder. Primary antibodies anti-HA, -myc, -Flag, -phospho-ERK1/2, - β arr1/2 were used according to the instructions from the manufacturer. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin Gs were used at a dilution of 1:5,000, and immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence.

Sample Preparation and Trypsin Digestion for LC-MS/MS. The gel slices were washed with 100% acetonitrile for 10 min followed by H₂O for 20 min, this was repeated twice and the samples were dried using a speed vacuum. Proteins were reduced in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 7.5) containing 10 mM DTT and incubated for 1 h at 56°C, followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide for 1 h at 25°C in the dark. The samples were washed and dried again as described above. Proteins were digested overnight with sequencing grade modified trypsin (enzyme:protein ratio of 1:50) at 37 °C. Peptides from the gel slices were extracted using 100% acetonitrile. The samples were then evaporated to dryness in a SpeedVac.

Liquid Chromatography and Nanoflow LC-MS/MS. Peptides were injected into a nanoflow HPLC system (Eksigent, Thermo Fisher Scientific) for online reversed-phase chromatographic separation; peptides were loaded on 5 mm long trap column (inner diameter 300 μ m) in buffer A (0.2% FA) and separated on 18 cm long fused silica capillary analytical column (inner diameter 150 μ m), both packed with 3 μ m 200Å Magic C18 AQ reverse-phase material (Michrom). Peptides were eluted by an increasing concentration of buffer B (0.2% FA in ACN) – from 5 to 40% in 100 min. Following the gradient elution, the column was washed with 80% buffer B and re-equilibrated with 5% buffer B. Peptides were eluted into the mass spectrometer at a flow rate of 600 nl/min. The total run time was approximately 70 min, including sample loading and column conditioning. Peptides were analyzed using an automated data-dependent acquisition on a LTQ-Orbitrap Elite or Q Exactive mass spectrometer. For LTQ-Orbitrap Elite analysis, each MS scan was acquired at a resolution of 240,000 full width half maximum (FWHM) (at 400 m/z) for mass range 300-2,000 with the lock mass option enabled (m/z: 445.120025) and was followed by up to 12 MS/MS data dependent scans on the most intense ions using collision induced activation (CID). Automatic gain control (AGC) target values for MS and MS/MS scans were set to 1e6 (max fill time 500 ms) and 1e5 (max fill time 50 ms)

respectively. The precursor isolation window was set to 2 with CID normalized collision energy of 35; the dynamic exclusion window was set to 60 seconds. For Q Exactive analysis, each MS scan was acquired at a resolution of 70,000 FWHM (at m/z 200) for mass range 300-2,000 and the 12 most intense peaks were fragmented in the HCD collision cell with normalized collision energy (NCE) of 25%. AGC target values for MS and MS/MS scans were set to $1e6$ and the dynamic exclusion window was set to 15 seconds.

MS Data Acquisition. MS data were analyzed using Mascot Distiller software and searched against the UniProtKB/Swiss-Prot protein knowledgebase release 2014_11 database (<http://www.web.expasy.org>) containing 547085 entries. For database searching, the enzyme specificity was set to trypsin with the maximum number of missed cleavages set to 2. The precursor mass tolerance was set to 10 ppm. Search criteria included a static modification of cysteine residues of +57.0214 Da; a variable modification of +15.9949 Da to include potential oxidation of methionines; and a modification of +79.966 on serine, threonine, or tyrosine for the identification of phosphorylation. Ion score cut-off and significance threshold p-values were set to 25 and 0.05, respectively.

Data analysis and statistics. All graphs were generated and analyzed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Data represented are the means \pm SEM of a least three independent experiments. Statistical analysis was performed using either paired Student's t-test when two values are compared or one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test when more than two values are compared to the control. NS = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Acknowledgements

We thank Monique Lagacé for critical reading of the manuscript. We are grateful to Stéphane Laporte for providing recombinant β arr1/2; Martin Audet and Viktoriya Lukashova from Michel Bouvier's laboratory as well as Darlène Pétrin and Eugénie Goupil from Terrence Hébert's laboratory for providing: pIRES-*HA-V2R-vYFP*, pIRES-*HA-AT1R-vYFP* and both *Ha-FP-vYFP* and *FP-RLucII* plasmids, respectively. We are also grateful to Dr. Robert Lefkowitz for providing β arr1/2 KO MEFs. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants MOP10501 (to M.B.) and MOP123408 (to P.P.R.), a grant from the Human Frontier Science Program (to P.P.R.), a Projet ARC grant (to M.G.H.S.), grants from the Ligue Contre le Cancer Comité de l'Oise (to H.E. and M.G.H.S), and from the Fondation pour la Recherche Médicale (to S.M.). M.B. and P.P.R. hold Canada Research Chairs in Signal Transduction and Molecular Pharmacology, and Cell Signaling and Proteomics, respectively.

References

1. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. FASEB J, 1995. **9**(9): p. 726-35.
2. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
3. Schlessinger, J., *Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor*. Cell, 2002. **110**(6): p. 669-72.
4. McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3113-21.
5. Marinissen, M.J. and J.S. Gutkind, *G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(7): p. 368-76.
6. Delcourt, N., J. Bockaert, and P. Marin, *GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(12): p. 602-7.
7. Kolch, W., et al., *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 249-52.
8. Koch, W.J., et al., *Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12706-10.
9. Crespo, P., et al., *Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits*. Nature, 1994. **369**(6479): p. 418-20.
10. Lev, S., et al., *Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 737-45.
11. Lopez-Illasaca, M., et al., *Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma*. Science, 1997. **275**(5298): p. 394-7.
12. Luttrell, L.M., et al., *Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes*. Science, 1999. **283**(5402): p. 655-61.
13. DeFea, K.A., et al., *beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2*. J Cell Biol, 2000. **148**(6): p. 1267-81.

14. Luttrell, L.M. and D. Gesty-Palmer, *Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling*. *Pharmacol Rev*, 2010. **62**(2): p. 305-30.
15. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. *Nature*, 1996. **379**(6565): p. 557-60.
16. Noma, T., et al., *Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(9): p. 2445-58.
17. Galet, C. and M. Ascoli, *Arrestin-3 is essential for the activation of Fyn by the luteinizing hormone receptor (LHR) in MA-10 cells*. *Cell Signal*, 2008. **20**(10): p. 1822-9.
18. Hupfeld, C.J. and J.M. Olefsky, *Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins*. *Annu Rev Physiol*, 2007. **69**: p. 561-77.
19. Lin, F.T., Y. Daaka, and R.J. Lefkowitz, *beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(48): p. 31640-3.
20. Oligny-Longpre, G., et al., *Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(17): p. E1028-37.
21. Dalle, S., et al., *Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 15688-95.
22. Hinney, A., et al., *Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(9): p. 4258-67.
23. Kim, J., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors*. *Biochemistry*, 2003. **42**(10): p. 2887-94.
24. Hollenberg, M.D., *Tyrosine kinase-mediated signal transduction pathways and the actions of polypeptide growth factors and G-protein-coupled agonists in smooth muscle*. *Mol Cell Biochem*, 1995. **149-150**: p. 77-85.
25. Benovic, J.L., et al., *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*, 1986. **83**(9): p. 2797-801.

26. Pitcher, J.A., N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz, *G protein-coupled receptor kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 653-692.
27. Bouvier, M., et al., *Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization*. *Nature*, 1988. **333**(6171): p. 370-3.
28. Benovic, J.L., et al., *Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(11): p. 7094-101.
29. Hausdorff, W.P., et al., *Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(21): p. 12657-65.
30. Lin, F.T., et al., *Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 15971-4.
31. Khoury, E., et al., *Differential regulation of endosomal GPCR/beta-arrestin complexes and trafficking by MAPK*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(34): p. 23302-17.
32. Gales, C., et al., *Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(9): p. 778-86.
33. Carriere, A., et al., *Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation*. *Curr Biol*, 2008. **18**(17): p. 1269-77.
34. Campbell, A.K. and R.L. Dormer, *Studies on free calcium inside pigeon erythrocyte 'ghosts' by using the calcium-activated luminescent protein, obelin*. *Biochem Soc Trans*, 1975. **3**(5): p. 709-11.
35. Vila-Coro, A.J., et al., *The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway*. *FASEB J*, 1999. **13**(13): p. 1699-710.
36. Quoyer, J., et al., *Pepducin targeting the C-X-C chemokine receptor type 4 acts as a biased agonist favoring activation of the inhibitory G protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(52): p. E5088-97.

37. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
38. Minden, A., et al., *Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK*. Science, 1994. **266**(5191): p. 1719-23.
39. Frost, J.A., et al., *A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3844-8.
40. Charest, P.G., et al., *The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling*. Cell Signal, 2007. **19**(1): p. 32-41.
41. English, J.M. and M.H. Cobb, *Pharmacological inhibitors of MAPK pathways*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(1): p. 40-5.
42. Goupil, E., et al., *Biasing the prostaglandin F2alpha receptor responses toward EGFR-dependent transactivation of MAPK*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(7): p. 1189-202.
43. Kohout, T.A., et al., *beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1601-6.
44. Roux, P.P., et al., *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13489-94.
45. Hornbeck, P.V., et al., *PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D261-70.
46. 2014, C.C.G.I. *Molecular Operating Environment (MOE) software (last accessed July 2015)*. Available from: <http://www.chemcomp.com>.
47. Signoret, N., et al., *Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4*. J Cell Biol, 1997. **139**(3): p. 651-64.
48. Liles, W.C., et al., *Activation of protein kinase C induces rapid internalization and subsequent degradation of muscarinic acetylcholine receptors in neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 1986. **261**(12): p. 5307-13.
49. Kelleher, D.J., et al., *Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the beta-adrenergic receptor in turkey erythrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(14): p. 4316-20.

50. Innamorati, G., et al., *A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2222-6.
51. Gimenez, L.E., et al., *Role of receptor-attached phosphates in binding of visual and non-visual arrestins to G protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 2012. **287**(12): p. 9028-40.
52. Carriere, A., et al., *ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1)*. J Biol Chem, 2011. **286**(1): p. 567-77.
53. Gales, C., et al., *Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells*. Nat Methods, 2005. **2**(3): p. 177-84.
54. Busillo, J.M., et al., *Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7805-17.
55. Percherancier, Y., et al., *Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9895-903.
56. van der Westhuizen, E.T., et al., *Quantification of Ligand Bias for Clinically Relevant beta2-Adrenergic Receptor Ligands: Implications for Drug Taxonomy*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(3): p. 492-509.
57. Zimmerman, B., et al., *Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs*. Sci Signal, 2012. **5**(221): p. ra33.
58. Goupil, E., et al., *A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25624-36.
59. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17201-17210.
60. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 299-313.

61. Mercier, J.F., et al., *Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44925-31.

Figure Legends

Fig. 1. ERK/MAPK pathway activation reduces Gi activation and second messenger production as well as GRK2 and β arr2 translocation in response to CXCR4 activation.

(A) Schematic representation of the BRET-based ligand-induced Gi activation assay. (B-C) CXCL12-promoted Gi activation measured by BRET in HEK293T cells co-transfected with HA-CXCR4, $G\alpha_{i1}$ -RlucII, $G\beta_1$, $G\gamma_2$ -GFP10, without (Control) or with either flag-Ras CA, flag-Ras DN (B), flag-MEK CA or flag-MEK DN (C). BRET400-GFP10 between $G\alpha_{i1}$ -RlucII and $G\gamma_2$ -GFP10 was measured after coel-400a addition, 3 minutes following the addition of CXCL12. Data are expressed as agonist promoted BRET (Δ BRET; see Fig. S1A). (D) Schematic representation of the Obelin-based Ca^{2+} mobilization assay. (E-F) CXCL12-promoted intracellular calcium increase measured in HEK293T cells transfected with Obelin-Cherry in the absence (Control) or presence of the indicated Ras and MEK mutants. Luminescence was measured every second for 60s after injection of CXCL12 or calcium ionophore A23187. Graph bar represent the area under the curve calculated from the kinetic curves (Fig. S1B). (G,J) Schematic representation of the BRET-based ligand-induced GRK2 (G) and β arr2 (J) translocation. (H,I,K,L) CXCL12-promoted BRET was measured in HEK293T cells transfected with CXCR4-RlucII and GRK2-GFP10 (H,I) or β arr2-GFP10 (K,L), in the absence (Control) or presence of the indicated Ras and MEK mutants. BRET400-GFP10 between CXCR4-RlucII and GRK2-GFP10 or β arr2-GFP10 was measured after coel-400a addition, 15 minutes following the addition of CXCL12. Data are expressed as agonist-promoted BRET (Δ BRET; see Fig. S1C-D). In all cases, data shown represent the mean \pm SEM of three independent experiments and were normalized to 100% of the control condition. Expression of CA or DN forms of flag-Ras or flag-MEK, total ERK1/2 and ERK1/2 activation status ((p)ERK1/2), was assessed by immunoblotting (representative experiments are shown at the bottom of the graphs).

Fig. 2. ERK/MAPK pathway activation reduces cell surface expression of CXCR4.

(A) Schematic representation of the receptor cell surface expression assay (PM, plasma membrane). (B,C) Cell surface CXCR4 levels were detected in HEK293T cells stably expressing HA-CXCR4-vYFP transfected without (Control) or with the indicated Ras and MEK

mutants. Cells were labeled with a primary anti-HA and secondary Alexa647-coupled chicken anti-mouse IgG antibodies, without permeabilization. Cell surface expression of HA-CXCR4-vYFP, in the absence of CXCL12 stimulation, was measured by dual flow-cytometry. vYFP emission represents CXCR4 total expression whereas AlexaFluor647 emission represents CXCR4 plasma membrane expression. The relative cell-surface expression (ratio Alexa/vYFP mean emissions) is calculated from the YFP positive cell population and expressed as a percentage of the control condition. Data shown represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Expression of CA or DN forms of flag-Ras or flag-MEK, total ERK and ERK1/2 activation status, ((p)ERK1/2), was assessed by immunoblotting (representative experiments are shown at the bottom of the graphs).

Fig. 3. ERK/MAPK pathway activation leads to the redistribution of CXCR4 into intracellular vesicles (sequestration). CXCR4-YFP localization was assessed by fluorescence confocal microscopy in HeLa cells transfected with CXCR4-YFP, with or without the indicated Ras and MEK mutants. Black bar = 10 μ m. Intensity as a function of distance along a selected transversal section (red bar) was assessed using the ImageJ software. Plots generated from phase contrast images were used to identify the coordinates of the plasma membrane (PM) and the intracellular compartment of the cell. These coordinates are schematically indicated above the YFP intensity plots. Data shown are representative of more than twenty cells obtained from three independent experiments. Quantifications are presented in Fig. S2.

Fig. 4. Acute pharmacological ERK/MAPK pathway activation blunts CXCR4 signaling by reducing receptor cell surface localization. (A) CXCL12-promoted β arr2 translocation is measured by BRET in HEK293T cells transfected with CXCR4-RlucII and β arr2-GFP10. Cells were pretreated with PD184352 for 30 min prior to stimulation with EGF for 15min or PMA for 30 min. BRET400-GFP10 between CXCR4-RlucII and β arr2-GFP10 was measured after coel-400a addition 15 minutes following CXCL12 addition. (B) CXCR4 cell surface expression levels were assessed by dual flow cytometry in HEK293T cells stably expressing HA-CXCR4-vYFP that were pretreated or not with PD184352 for 30 min prior to stimulation with EGF for 15min or PMA for 30 min. (C) Kinetics of CXCR4 cell surface level reduction and ERK1/2 activation following EGF or PMA treatments. (D) Kinetics of CXCR4 cell surface level

reduction and ERK1/2 activation in HEK293T cells transfected with HA-CXCR4-vYFP and myc-V2R pretreated or not with PD184352 for 30 min prior to stimulation with AVP for the indicated time. (E) CXCR4 cell surface expression level in SupT1 cells treated or not with EGF for 15min. In all cases, data shown represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments and are normalized to 100% of the control conditions. Total ERK1/2 and ERK1/2 activation status, ((p)ERK1/2), were assessed by immunoblotting.

Fig. 5. ERK/MAPK pathway activation blunts signaling by reducing cell surface expression of V2R and AT1R. cAMP accumulation (GFP10-EPAC-RLucII (*A, left panel*)), calcium mobilization (Obelin-Cherry, (*B,C, left panel*)), GRK2 recruitment (GRK2-GFP10, (*A,B, center left panel*)), β arr2 recruitment (β arr2-GFP10, (*A,B center right panel; C, center panel*)) were measured in HEK293T cells transfected with the indicated receptors (V2R (*A*), AT1R (*B*) or FP (*C*)), along with the appropriate biosensors in the absence (Control) or presence of the indicated MEK mutants. Cellular activities were measured by BRET, as in Fig.1, following the addition of AVP (*A*), AngII (*B*) or PGF-2 (*C*). Cell surface expression (*A-C, right panel*) was measured by dual flow cytometry in the absence of ligand stimulation as in Fig. 2. Data shown are the mean \pm SEM of at least three independent experiments and were normalized to the control condition (100%).

Fig. 6. ERK1/2-dependent β arr2 phosphorylation on S14 and T276 induces CXCR4 intracellular sequestration. (*A-C*) CXCR4 cell surface expression was assessed by dual flow cytometry in WT MEFs or β arr1/2 KO MEFs transiently transfected with HA-CXCR4-vYFP, in the absence (Control) or presence of the indicated Ras mutants (*A*) with or without β arr1 and/or β arr2 complementation (*B,C*). (*D*) Phosphorylation of β arrs was performed with recombinant bovine β arr1 or β arr2 as a substrate and recombinant active ERK1, in the presence of [γ ³²P]-ATP for 15 minutes. Gel was stained with Coomassie, and ³²P incorporation was quantified using a PhosphorImager (left panel) or during a kinetics using scintillation counting (right panel). The data shown are representative of three independent experiments. (*E,F*) CXCR4 cell surface expression was assessed by dual flow cytometry in β arr1/2 KO MEFs transiently transfected with HA-CXCR4-vYFP, β arr2 WT or the indicated β arr2 mutants, with or without Ras CA. Data shown represent the mean \pm SEM of at least three independent

experiments and were normalized to the control condition (100%). Expression of β arr2 WT and mutants were assayed by immunoblotting.

Fig. S1. CXCR4 activates Gi calcium mobilization as well as GRK2 and β arr2 recruitment to the receptor. (A) Gi activation measured by BRET in HEK293T cells transfected with HA-CXCR4, *Gai1*-RlucII, *G β 1*, and *G γ 2*-GFP10. BRET400-GFP10 between *Gai1*-RlucII and *G γ 2*-GFP10 was measured after the addition of coel-400a in the absence (vehicle) or presence of CXCL12. (B) Cytoplasmic calcium was measured in HEK293T cells transfected with Obelin-Cherry by measuring luminescence every second for 60 s after the injection of CXCL12 or calcium ionophore A23187. (C and D) GRK2 (C) and β arr2 (D) translocation was measured by BRET in HEK293T cells transfected with CXCR4-RlucII and GRK2-GFP10 (C) or β arr2-GFP10 (D). BRET400-GFP10 between CXCR4-RlucII and GRK2-GFP10 or β arr2-GFP10 was measured after the addition of coel-400a in the absence (Vehicle) or presence of CXCL12. Data shown represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Ligand-induced BRET (Δ BRET) represents the difference between the basal BRET and the BRET values following ligand stimulation and is indicated by black arrows. ***P < 0.001.

Fig. S2. Quantification of CXCR4 sequestration in the cytoplasmic compartment upon ERK1/2 activation. Intensity plots derived from 20 confocal fluorescence microscopy images obtained in three independent experiments (illustrated in *Fig. 3*) were analyzed to quantify CXCR4 localization at the cell membrane and inside the cell. Data shown represent the mean \pm SEM of the 20 images and were normalized to the total fluorescence intensity (plasma membrane + intracellular compartment) set to 100% in each condition.

Fig. S3. Ser14 and Thr276 residues of β arr2 are putative ERK1/2 phosphorylation sites. (A) LC-MS/MS of bovine β arr2: peptide VYTITPLLSNNR, MH+ 1469.721, m/z 735.8681, charge 2+. The characteristic peptide bond fragment ions, type b and y ions, are labeled. Eight microliters of sample were injected into a nanoflow Eksigent HPLC system for online C18 reversed-phase chromatographic separation coupled to an LTQ-Orbitrap Elite or Q Exactive mass spectrometer. The mass spectrometer was operated in the data-dependent mode, in which a full-scan MS was followed by MS/MS scans of the three most abundant ions with

+2 to +4 charge states. (B) ERK1/2 putative phosphorylation sites Ser14 and Thr276. (Upper) Ribbon diagram of the β arr2 structure (PDB ID code 3P2D) depicted in orange. Putative sites for ERK1/2 phosphorylation (Ser14 and Thr276) are shown as spheres with carbon and oxygen atoms colored cyan and red, respectively. (Lower) Close-up of the structural environment of Ser14 and Thr276 putative phosphorylation sites. Side-chains of the amino acids in direct proximity of each site (within 4 Å) are highlighted in green and are shown as sticks and gray dots to represent their volume, illustrating the relative accessibility of each phosphorylation site. (C) Conservation between species of the three putative ERK1/2 phosphorylation sites in β arr2. (D) Conservation between human β arr1 and human β arr2 of the three putative ERK1/2 phosphorylation sites identified in β arr2.

Fig. S4. β arr2 nonphosphorylatable and phosphomimetic mutants are both recruited to CXCR4 upon CXCL12 stimulation. BRET titration curves were performed in HEK293T cells transfected with a constant amount of CXCR4-RlucII and increasing amounts of β arr2 (WT, ST/2A, or ST/2D)-GFP10. BRET400-GFP10 between CXCR4-RlucII and β arr2 (WT, ST/2A, or ST/2D)-GFP10 was measured after the addition of coel-400a, 15 min following the addition of CXCL12. The table gives the BRET50 and the BRETmax of each condition extrapolated from the nonlinear regression fits. Data are expressed as agonist-promoted BRET (Δ BRET; *Fig. S1D*); the curves shown are derived from individual titration curves that are representative of three independent experiments. Error bars represent the mean \pm SEM from three independent experiments.

Figure 1

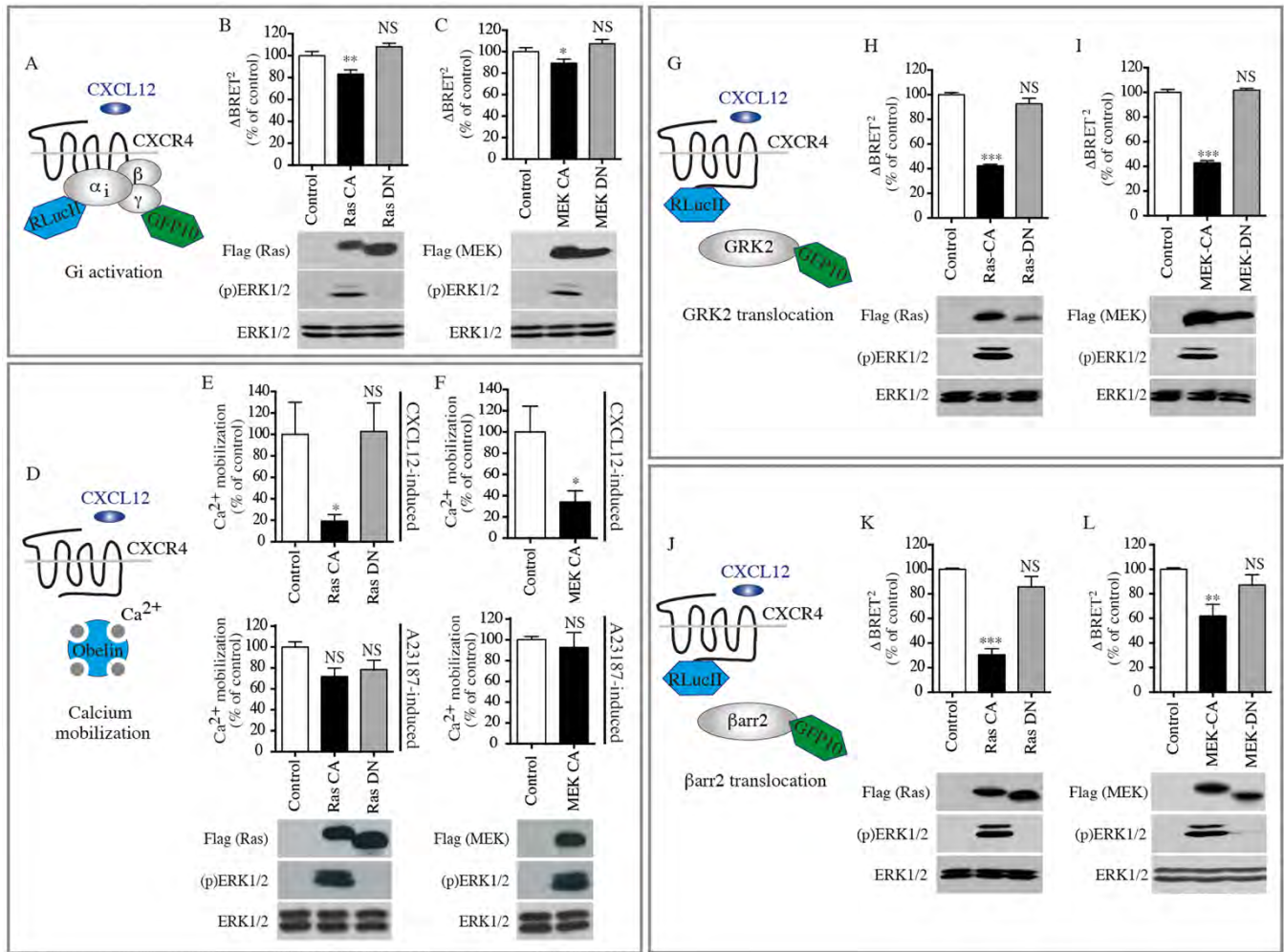


Figure 2

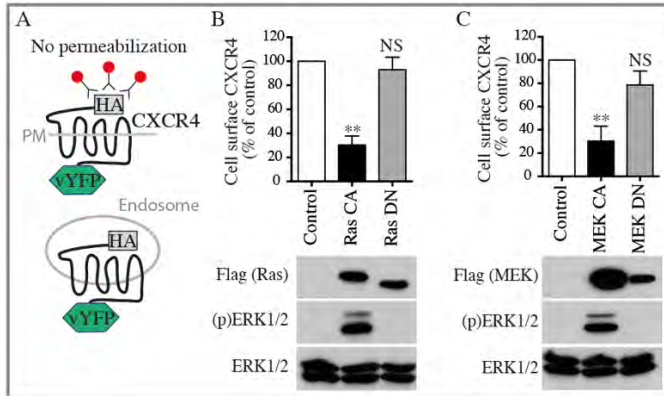


Figure 3

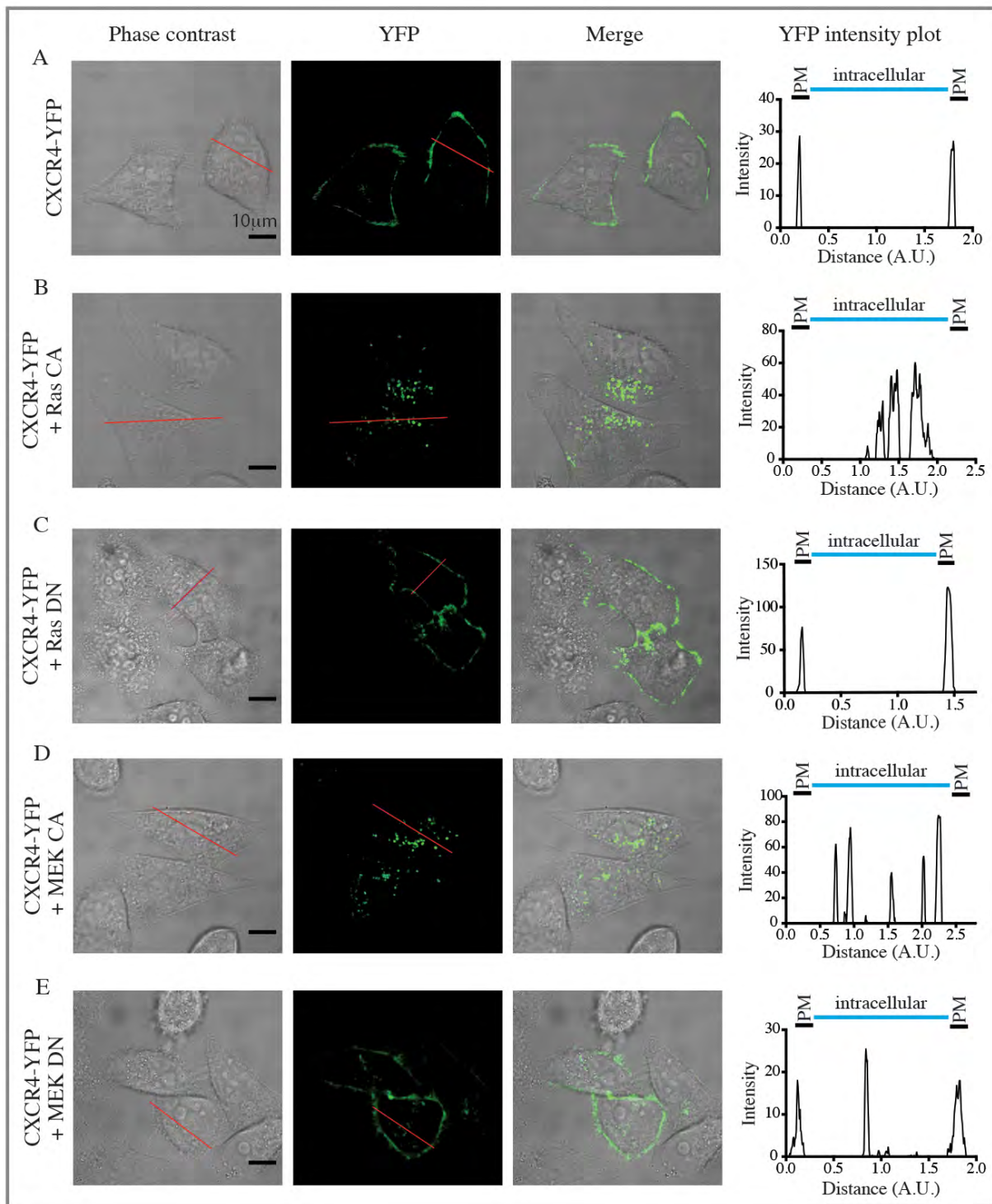


Figure 4

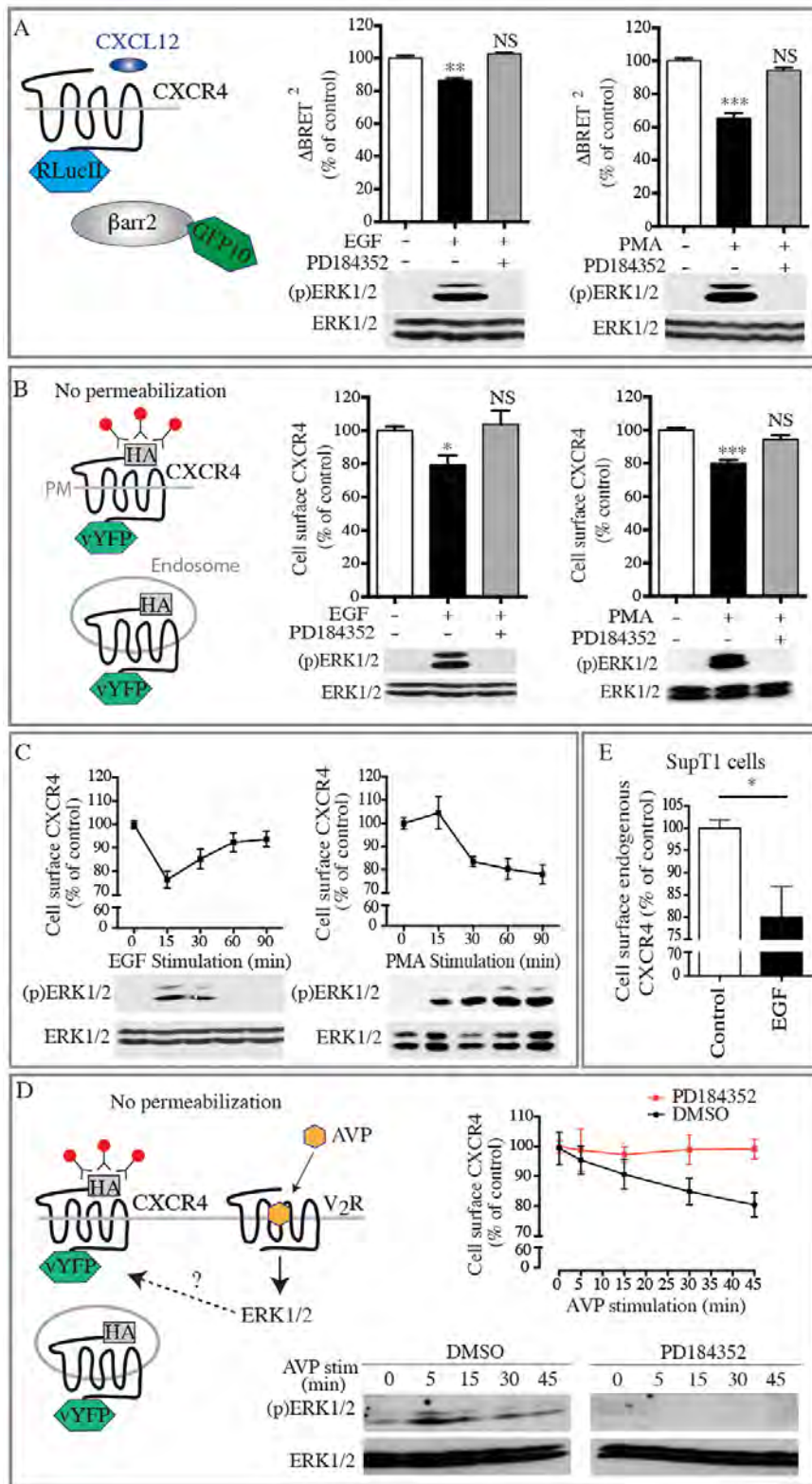


Figure 5

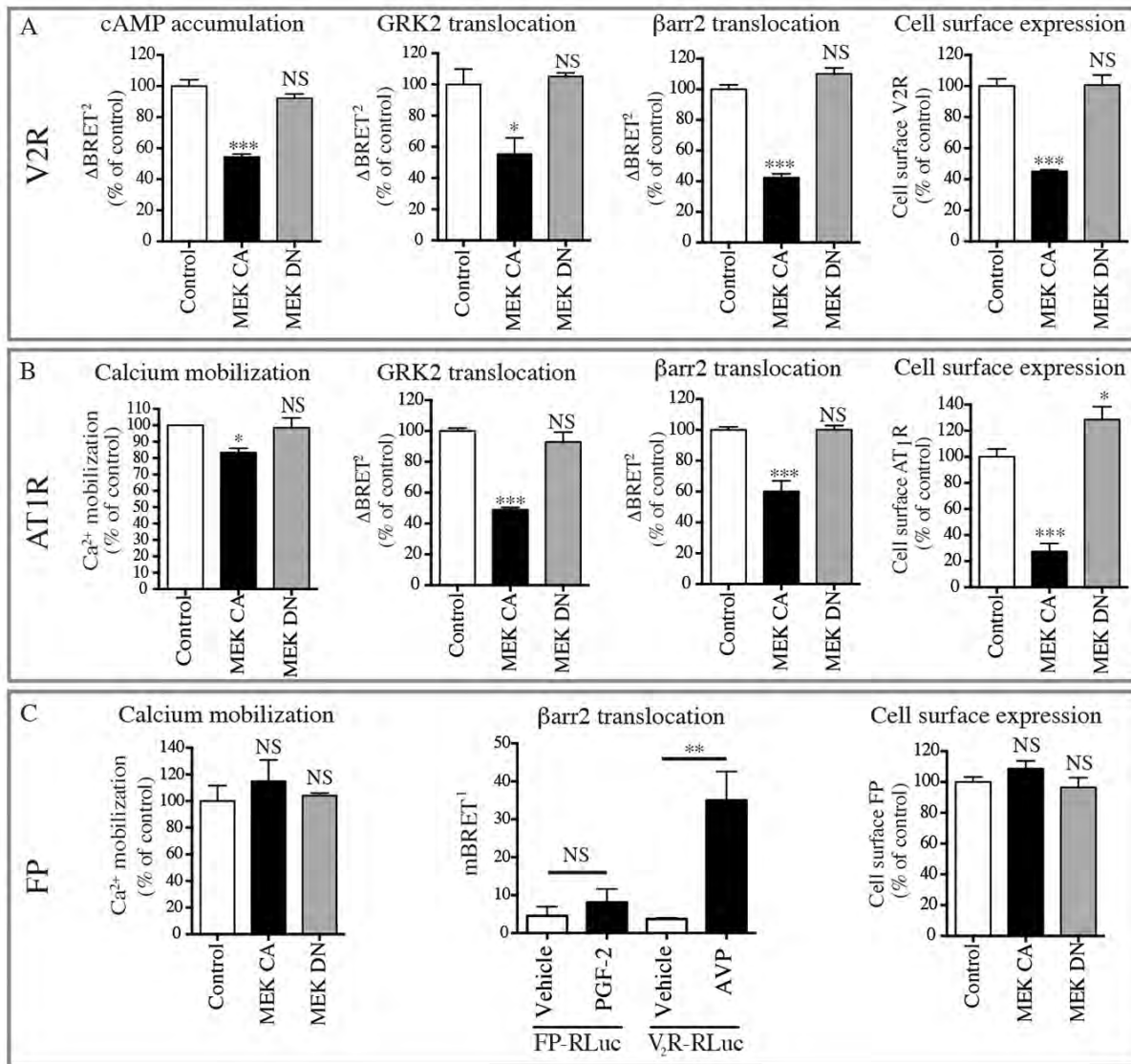
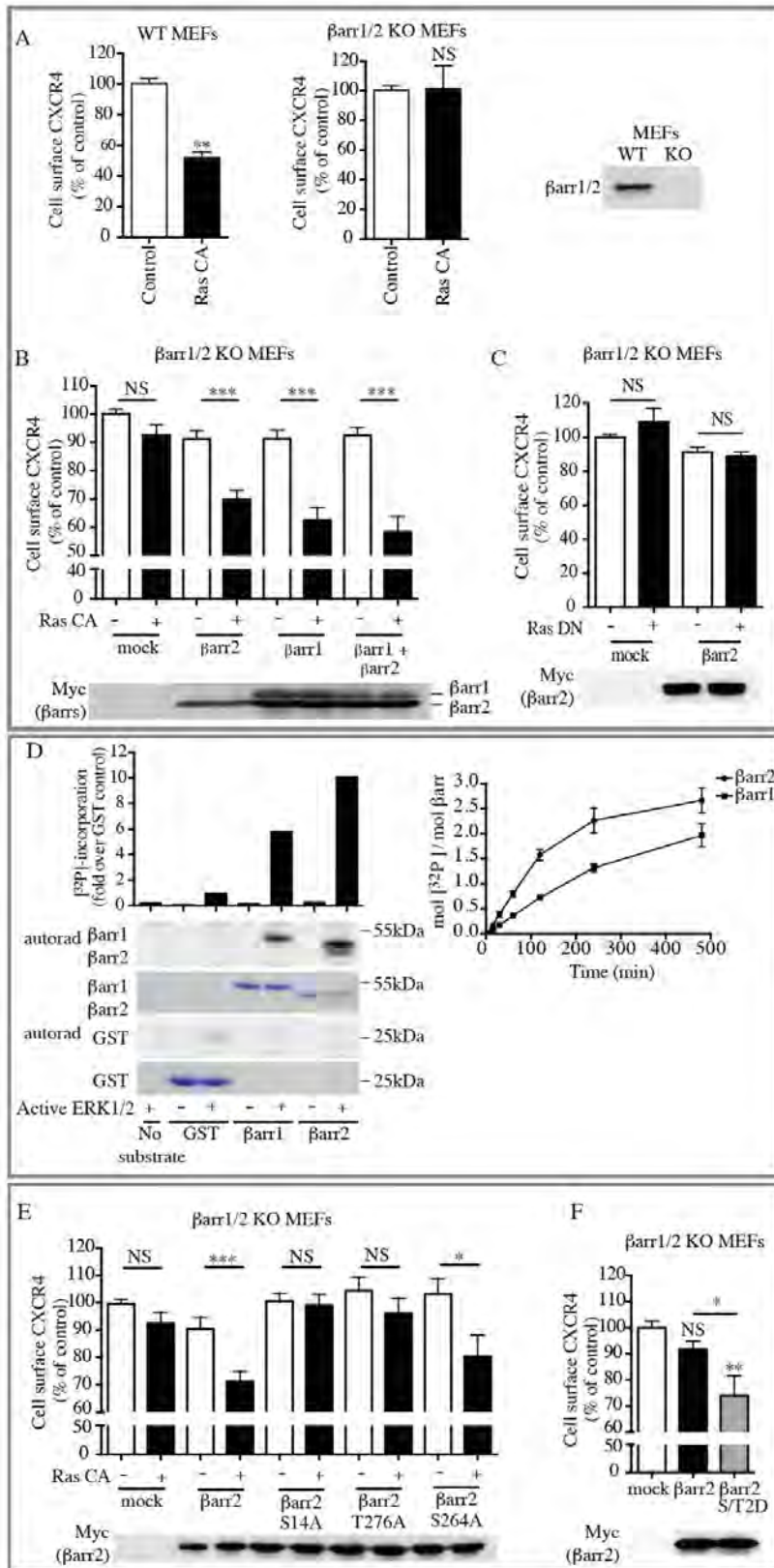
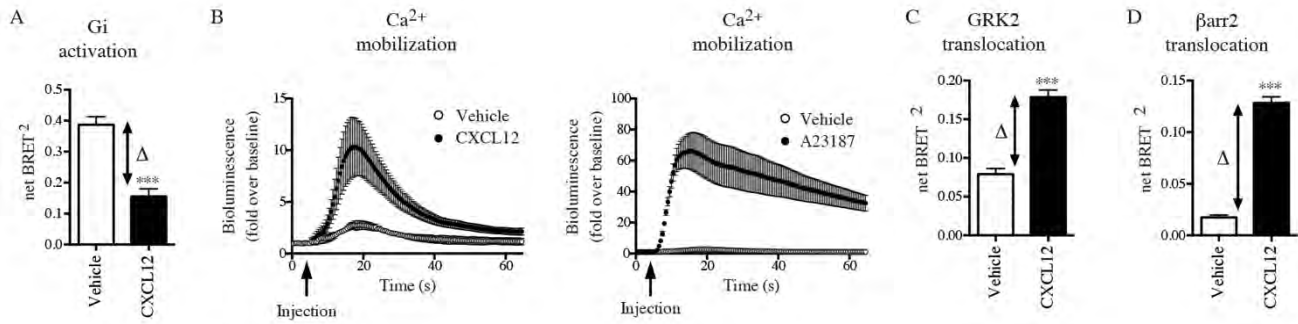


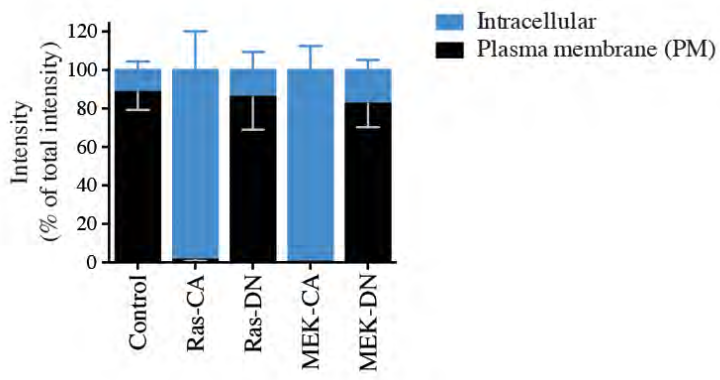
Figure 6



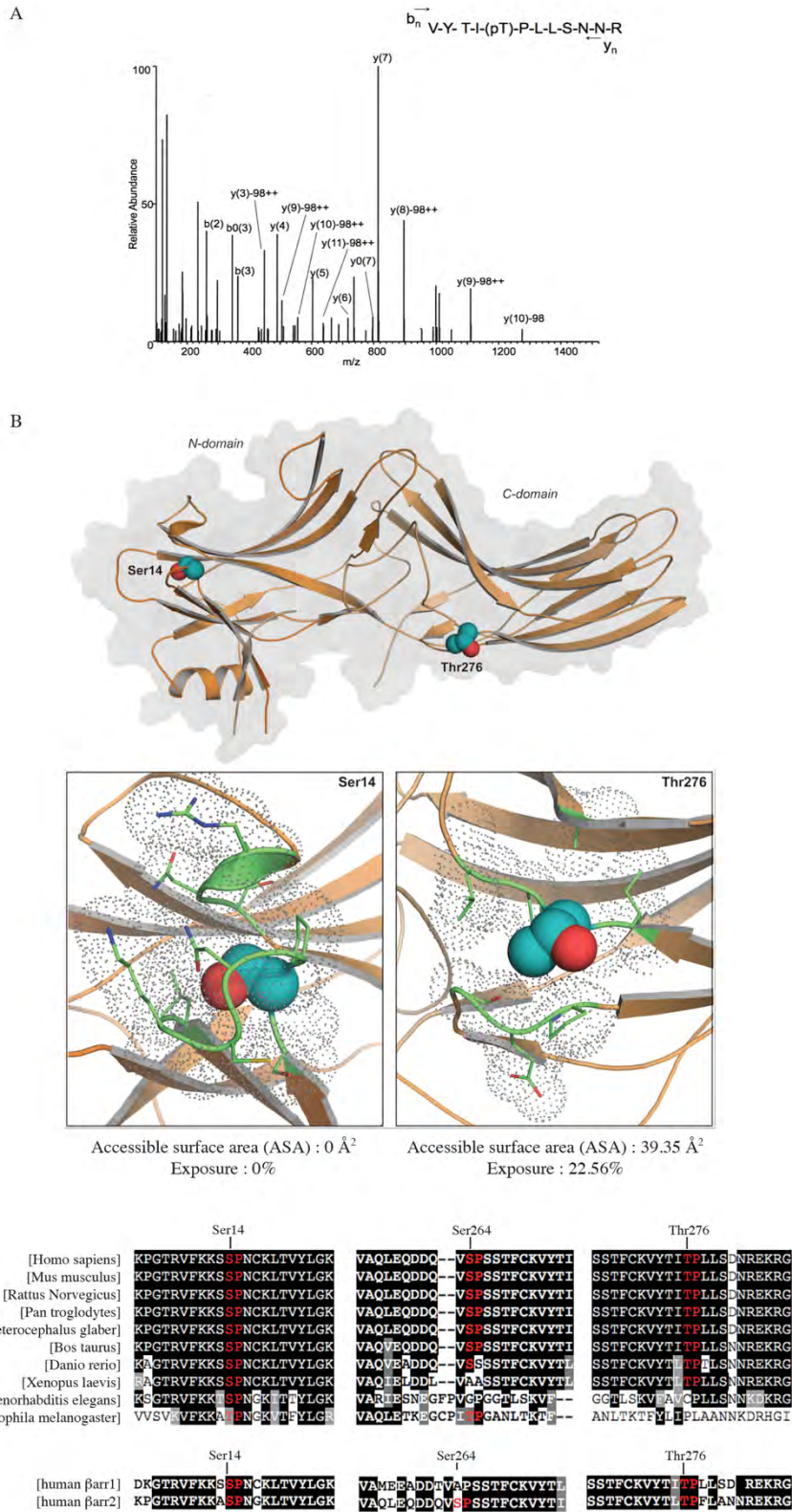
Supplementary Figure 1



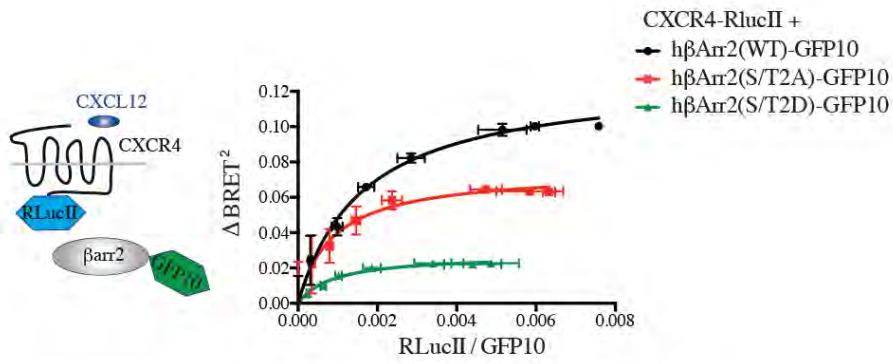
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



	βarr2	βarr2(S/T2A)	βarr2(S/T2D)
BRETmax	0.13 ± 0.004	0.08 ± 0.003	0.03 ± 0.0005
BRET50	0.0016 ± 0.0002	0.009 ± 0.0001	0.009 ± 0.00005

Article 2

A New Inhibitor of the β -arrestin/AP2 Endocytic Complex Reveals Interplay Between GPCR Internalization and Signaling

Alexandre Beautrait*, **Justine S. Paradis***, Brandon Zimmerman*, Jenna Giubilaro, Ljiljana Nikolajev, Sylvain Armando, Hiroyuki Kobayashi, Lama Yamani, Yoon Namkung, Franziska Heydenreich, Etienne Khoury, Martin Audet, Philippe. P. Roux, Dmitry Veprintsev, Stéphane A. Laporte et Michel Bouvier. ***Contributions équivalentes des auteurs**

Publié dans *Nature Communications*, le 18 avril 2017

Résumé

En plus de son rôle dans la désensibilisation et l'endocytose des RCPG, le recrutement de β -arrestine au récepteur stimulé par un ligand active des cascades de signalisation non-canoniques. Faire la distinction entre la contribution relative du recrutement de β -arrestine au récepteur, ou de l'endocytose dépendante de β -arrestine dans l'activation de ces voies de signalisation par le récepteur, est limité par le manque d'outils analytiques sélectifs. Dans cette étude, en combinant criblage virtuel et essais cellulaires, nous avons identifié une petite molécule qui inhibe de manière sélective l'interaction entre β -arrestine et la sous-unité β 2-adaptine de la protéine adaptatrice de liaison à la clathrine AP2, ceci sans interférer avec la formation du complexe récepteur/ β -arrestine. Cet inhibiteur sélectif de l'interaction β -arrestine/ β 2-adaptine (Barbadin) bloque l'endocytose induite par l'agoniste des récepteurs prototypiques β 2AR, V2R et AT1R, mais n'a pas d'effet sur l'endocytose des récepteurs internalisant indépendamment de β -arrestine (transferrine), ou d'AP2 (ET_{AR}). De manière intéressante, Barbadin bloque intégralement l'activation de ERK1/2 suite à la stimulation du récepteur V2R, et réduit l'accumulation d'AMPC promue par V2R et β 2AR. Ces résultats supportent le concept d'une signalisation dépendante de β -arrestine/AP-2, à la fois pour les voies dépendantes et indépendantes des protéines G.

Contributions

Dans cette étude, j'ai contribué au design expérimental et à la génération d'une partie substantielle des résultats incluant : les expériences de thermostabilité de $\beta 2$ -adaptine (en collaboration avec F. Heydenreich et D. Veprintsev), la mesure de l'endocytose des récepteurs en EbBRET et en microscopie par BRET (en collaboration avec H. Kobayashi), la comparaison de Barbadin avec différents analogues commerciaux, les essais de réversibilité du composé, les mesures d'activation de la protéine G, la cinétique d'endocytose du récepteur à la transferrine, la comparaison entre l'efficacité d'inhibition de l'endocytose par le composé Dyngo-4a et Barbadin, et certains des essais mesurant l'interaction entre β -arrestine-1/2 et $\beta 2$ -adaptine par BRET. J'ai activement participé à la correction du manuscrit lors du processus de révisions.

A New Inhibitor of the β -arrestin/AP2 Endocytic Complex Reveals Interplay Between GPCR Internalization and Signaling

Alexandre Beaudrait^{1*}, Justine S. Paradis^{3*}, Brandon Zimmerman^{5*}, Jenna Giubilaro⁵, Ljiljana Nikolajev⁴, Sylvain Armando⁴, Hiroyuki Kobayashi¹, Lama Yamani⁴, Yoon Namkung⁴, Franziska Heydenreich⁷, Etienne Khoury⁴, Martin Audet¹, Philippe P. Roux², Dmitry Veprintsev⁷, Stéphane A. Laporte^{4,5,6} and Michel Bouvier¹

Department of Biochemistry¹, Pathology and Cellular Biology² and Molecular Biology Program³, Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3T 1J4

Departments of Medicine⁴, Pharmacology and Therapeutics⁵, and Anatomy and Cell Biology⁶, Research Institute of McGill University Health Centre (RI-MUHC), McGill University, Montréal, QC, Canada, H4A 3J1

Laboratory of Biomolecular Research⁷, Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen PSI, Switzerland

** These authors contributed equally.*

Correspondence should be addressed to: M.B. (E-mail: michel.bouvier@umontreal.ca) and S.A.L (E-mail: stephane.laporte@mcgill.ca).

ABSTRACT

In addition to G protein-coupled receptor (GPCR) desensitization and endocytosis, β -arrestin recruitment to ligand-stimulated GPCRs promotes non-canonical signaling cascades. Distinguishing the respective contributions of β -arrestin recruitment to the receptor and β -arrestin-promoted endocytosis in propagating receptor signaling has been limited by the lack of selective analytical tools. Here, using a combination of virtual screening and cell-based assays, we have identified a small molecule that selectively inhibits the interaction between β -arrestin and the β 2-adaptin subunit of the clathrin adaptor protein AP2 without interfering with the formation of receptor/ β -arrestin complexes. This selective **β -arrestin/ β 2-adaptin inhibitor** (Barbadin) blocks agonist-promoted endocytosis of the prototypical β 2-adrenergic (β 2AR), V2-vasopressin (V2R) and angiotensin-II type-1 (AT1R) receptors, but does not affect β -arrestin-independent (transferrin) or AP2-independent (endothelin-A) receptor internalization. Interestingly, Barbadin fully blocks V2R-stimulated ERK1/2 activation and blunts cAMP accumulation promoted by both V2R and β 2AR, supporting the concept of β -arrestin/AP2-dependent signaling for both G protein-dependent and -independent pathways.

INTRODUCTION

Beta-arrestins (β -arrestin1 and β -arrestin2) play central roles in the mechanisms regulating G protein-coupled receptor (GPCR) signaling and trafficking^{1, 2}. The recruitment of β -arrestin to phosphorylated activated GPCRs at the plasma membrane following sustained agonist stimulation, promotes desensitization by functionally uncoupling the activated receptors from their heterotrimeric G proteins³. Complexes formed between ligand-occupied GPCRs and β -arrestin are then directed to the endocytic machinery, leading to their interaction with clathrin and its adaptor protein AP2, followed by the internalization of the receptors^{4, 5, 6}. Once internalized and targeted to early endosomes, receptors can either be recycled back to the plasma membrane or targeted toward lysosomal degradation. The fate of the endocytosed receptors has been inferred to depend largely on the stability of the interaction between the internalized receptor and β -arrestin⁷; where the more labile complexes lead to rapid recycling of receptor, whereas more stable interactions prevent recycling and favor receptor degradation. Although endocytosis was first linked to receptor desensitization and resensitization, more recent evidence suggest that internalized receptors can engage in various signaling activities^{8, 9}. For instance, endocytosis has been linked to the β -arrestin-dependent activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK)¹⁰ and the sustained activation of adenylyl-cyclase by some receptors^{11, 12, 13}. Despite the well-established contribution of β -arrestins in various steps of receptor trafficking and signaling, spatial and temporal causative links between these responses have remained difficult to probe, mainly because of the lack of selective pharmacological tools.

Several endocytic paths have been described for GPCRs, including both clathrin-dependent and -independent events^{14, 15}, with the vast majority of GPCRs undergoing β -arrestin-dependent, clathrin-mediated endocytosis. Upon binding to agonist-bound receptor, β -arrestin undergoes a major conformational change, adopting an active conformation that is characterized by the release of its C-terminus, which is buried in its polar core¹⁶. The exposed β -arrestin C-tail constitutes an accessible site (DxxFxxFxxxR motif) for the binding of the β 2-adaptin subunit of the AP2 complex, which directs the receptor/ β -arrestin complexes into maturing clathrin-coated pits (CCPs)^{17, 18}. A tripartite interaction exists between β -arrestin, AP2 and clathrin in CCPs (*i.e.* each protein involved in a direct interaction with the other two proteins) and the interaction between β -arrestin and AP2 is an important initial step in localizing GPCRs into the CCP, following agonist stimulation¹⁷. The structural determinants for β -arrestin and AP2 interaction have been well-defined^{17, 19}, and more recently validated by a co-crystal between the β 2-adaptin subunit of AP2 and a peptide fragment of β -arrestin1 C-terminus²⁰. Most of our knowledge concerning GPCR endocytosis and β -arrestin-dependent signaling has been gained through mutagenesis and protein depletion studies in particular for β -arrestins, which would indiscriminately affect recruitment of β -arrestin to receptors, desensitization, endocytosis and β -arrestin-mediated signaling^{21, 22, 23}. Specific pharmacological probes targeting β -arrestin/AP2 complexes would be invaluable for determining the role of this complex and clathrin-mediated endocytosis in GPCR signaling.

In this light, we have used a virtual screening approach to identify specific inhibitors of β -arrestin/AP2 complexes. For this purpose, we took advantage of a well-defined groove within the β 2-adaptin ear platform subdomain, which accommodates the carboxyl-tail of β -arrestin²⁰,

hence providing a putative site for a small molecule interfering with the β -arrestin/AP2 interaction. Based on this structural insight, we combined virtual screening with a sensitive bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assay²⁴ to identify and validate novel inhibitors of the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction. From five compounds found to modulate the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction, two were inhibitors and one of them, which we named Barbadin (**β -arrestin/ β 2-adaptin interaction inhibitor**), was further characterized and used as a tool to study the interplay between receptor GPCR internalization and signaling.

RESULTS

Screening for a β -arrestin/ β 2-adaptin interaction inhibitor

To identify candidate inhibitors of the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction, we first performed a structure-based virtual screen through the use of molecular docking calculations (**Fig. 1a**, and methods). We took advantage of the available coordinates of the crystal structure of a complex between the β 2-adaptin ear domain of the clathrin adaptor protein AP2 and a C-terminal peptide of β -arrestin1 (PDB entry 2IV8)²⁰. In this complex, the β -arrestin peptide is situated in a groove located in the β 2-adaptin ear platform subdomain, where Phe-388, Phe-391 and Arg-395 from β -arrestin1 interact with key Glu-849, Tyr-888 and Glu-902 residues of β 2-adaptin. The virtual screen was performed using a region of the β 2-adaptin ear platform that included the entire binding groove as the target, and the Myriascreeen diversity collection of 10,000 compounds selected for their structural diversity and drug-likeness from an original chemical library of 300,000 molecules. Subsequently to docking calculations, the poses of the best-ranked molecules based on predicted binding energy (196 compounds) were visually inspected to select the candidates that make favorable interactions with residues from the β 2-adaptin groove, reported to be critical for β -arrestin binding¹⁹. Among these best candidates, 52 compounds were selected based on availability criteria. The list of these compounds with their acquisition number is presented in **Supplementary Table 1**.

To assess the ability of the 52 compounds to affect the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction, we used a BRET-based assay that directly monitors the interaction between these two proteins following agonist-stimulation of GPCRs²⁴. The vasopressin type-2 receptor (V2R), that was

previously shown to promote a large BRET increase between β -arrestin1-RlucII and β 2-adaptin-YFP upon arginine vasopressin (AVP) stimulation²⁴ (**Fig. 1b**), was chosen as receptor model for the screen. Before assessing the ability of the 52 compounds to modulate the BRET between β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RlucII, we verified whether the molecules could spectrally interfere with BRET measurements. When tested in HEK293 cells overexpressing either the β -arrestin1-RlucII or the β 2-adaptin-YFP alone, 11 of the 52 compounds that had a significant effect on either luminescence or fluorescence signals were discarded (**Supplementary Fig. 1**). The remaining 41 compounds were tested in live cells, using the aforementioned BRET-based assay in which the V2R, β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RlucII were co-expressed. As shown in **Fig. 1c**, five compounds significantly modulated the AVP-promoted BRET. Compounds #14, #19 and #20 potentiated, whereas compounds #33 and #42 inhibited the AVP-promoted BRET between β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RlucII. Compounds #14, #19 and #20 might favor the interaction between β -arrestin1 and β 2-adaptin, or modify the complex in a way that brings the YFP and RlucII moieties closer, or in an orientation which is more permissive for energy transfer. Although they may be interesting molecules in their own rights, we focused on characterizing compounds #33 and #42 because we sought to identify inhibitors of the β 2-adaptin/ β -arrestin complex.

To assess the potency of these compounds, concentration-response curves of the inhibitory actions of the compounds on the V2R-stimulated β -arrestin/ β 2-adaptin interaction were carried out. In addition to compounds #33 and #42, compound #1 was included in the analysis as a negative control (**Fig. 2a-c**). As expected, #1 was completely inactive even at the highest concentration used (**Fig. 2a**), whereas both #33 and #42 showed concentration-dependent

inhibitory responses. While #33 had a low potency ($>50 \mu\text{M}$) that was difficult to estimate with precision due to incomplete inhibition curve (**Fig. 2b**), #42 showed a well-defined sigmoidal inhibitory curve yielding an estimated IC_{50} of $19.1 \mu\text{M}$ for β -arrestin1 (**Fig. 2c**) and $15.6 \mu\text{M}$ for β -arrestin2 (**Supplementary Fig. 2a**). Compound #42, which structure is shown in **Fig. 2d**, represented a validated hit for a potential inhibitor of the complex and hence named Barbadin (for **β -arrestin/ β 2-adaptin inhibitor**), and further characterized at the expense of #33 that showed lower potency. First, the reversible mode of action of Barbadin was assessed by incubating cells with Barbadin for 30 min and monitoring BRET between β 2-adaptin and β -arrestin1 following, or not, extensive wash before AVP stimulation. As shown in **Supplementary Fig. 2b**, the washing procedure completely prevented the action of Barbadin demonstrating its reversibility.

To further investigate the potential binding mode of Barbadin on AP2, we examined the docking poses obtained for this compound. The docking calculations resulted in a single best pose, based on its prevalence among the possible solutions and the lowest binding energy that positioned Barbadin within the groove of the β 2-adaptin platform subdomain (**Fig. 2e**). The benzylphenyl moiety of Barbadin tightly fits a hydrophobic pocket lined mainly by Phe-837, Leu-838, Ile-876, Ala-877 and Tyr-888, via a set of non-polar and π - π aromatic interactions. Superimposition of the docking pose of Barbadin with the β 2-adaptin/ β -arrestin C-tail co-crystal structure suggests that both phenyl rings of Barbadin are adopting very similar binding modes as both β -arrestin's key Phe-391 and Phe-395 residues (**Fig. 2f**). The thieno-pyrimidinone moiety interacts through π - π aromatic interactions with Trp-841, and also through a network of two hydrogen bonds involving Tyr-888 and Glu-902 (**Fig. 2e**), two residues of β 2-adaptin

shown to be critical for the binding of β -arrestin¹⁹. In order to investigate the role of the benzylphenyl moiety in Barbadin's inhibitory activity, we conducted a preliminary structure-activity relationship study with four analogues of Barbadin. As shown in **Supplementary Fig. 3**, a branched aliphatic and/or extended phenyl group on Barbadin's thieno-pyrimidinone core is essential for its inhibitory action, consistent with the docking pose.

Additionally, to assess the direct binding of Barbadin to β 2-adaptin we performed a thermal-shift assay (TSA) using purified appendage domain of β 2-adaptin (β 2-appendage, amino-acids with sequence: 700-937). The stability curves obtained in **Fig. 2g** show that, similarly to a 20-mer β -arrestin C-tail peptide known to bind to the β -appendage²⁰, Barbadin promoted a dose-dependent rightward shift of the melting temperature consistent with a stabilization of the β -appendage due to the direct binding of the compound.

Barbadin selectively inhibits the β -arrestin/AP2 interaction

To rule out the possibility that Barbadin interferes directly at the level of the V2R, we assessed its effect on the β -arrestin1/ β 2-adaptin interaction by BRET, promoted by two additional GPCRs, the β 2-adrenergic receptor (β 2AR) and the angiotensin-II type-1 receptor (AT1R) (**Fig. 3a-c**). As was the case for the V2R, Barbadin inhibited the BRET between β -arrestin1-RlucII and β 2-adaptin-YFP promoted by the activation of both receptors. The β 2AR was selected because it differs from the V2R and AT1R in its mode of interaction with the β -arrestins⁷. The β 2AR is classified as a class A receptor, interacting transiently with β -arrestins and rapidly recycling back from the endosomes to the cell surface, whereas V2R and AT1R are class B

receptors forming tighter receptor/ β -arrestin complexes that reside for longer times in endosomes before being targeted to lysosomal degradation. These observations strongly suggest that the inhibition occurs at the level of the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction and is not a receptor specific effect.

We next evaluated the mode of action of Barbadin by testing its effect on the other isoform of β -arrestin, β -arrestin2, that is highly homologous to β -arrestin1 and would be predicted to interact with β 2-adaptin in a similar manner. As shown in **Fig. 3a-c**, Barbadin significantly inhibited the interaction between β 2-adaptin and both β -arrestins after stimulation of V2R, β 2AR or AT1R. Moreover, the extent of inhibition was comparable, in all cases Barbadin inhibiting the BRET signal by $\approx 50\%$. The higher agonist-promoted signal observed for β -arrestin2 versus β -arrestin1 upon β 2AR stimulation, compared to the similar signals measured for both β -arrestin isoforms following V2R or AT1R stimulation, is consistent with the notion that class A, but not class B receptors bind β -arrestin2 with greater avidity than β -arrestin1^{7, 24}.

To further assess whether Barbadin acts by selectively inhibiting the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin, and not by inhibiting the recruitment of β -arrestin to GPCRs, the effect of Barbadin was also tested on the time-dependent AVP-promoted BRET between either β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RlucII or V2R-YFP and β -arrestin1-RlucII (**Fig. 3d and e**). Barbadin strongly inhibited AVP-promoted BRET between β -arrestin1 and β 2-adaptin but was without effect on the V2R/ β -arrestin1 BRET induced upon AVP stimulation, thus confirming a

selective action on the β -arrestin/ β 2-adaptin complex. Similar results were obtained for the class A β 2AR (**Supplementary Fig. 4a,b**).

Fluorescence confocal microscopy confirmed that Barbadin did not inhibit the recruitment of β -arrestin2 to the plasma membrane upon V2R activation (**Supplementary Fig. 4c**). In fact, co-localization of V2R and β -arrestin2 at the plasma membrane was more readily detected following Barbadin treatment as compared to control conditions, consistent with the notion that it does not affect receptor/ β -arrestin interaction but that it inhibits internalization of receptor/ β -arrestin complexes, hence increasing their accumulation at the plasma membrane.

The specificity of the effect of Barbadin on the endocytic complex formation was also validated by co-immunoprecipitation and GST pull-down experiments. **Figure 3f** illustrates that Barbadin significantly inhibited AVP-promoted co-immunoprecipitation between endogenous β -adaptins and β -arrestin1/2 but did not affect the association with Epsin, a protein interacting with lower affinity than β -arrestin at a different site on β 2-adaptin's ear platform subdomain²⁵. Similarly, Barbadin significantly inhibited the ability of GST- β 2-adaptin to pull-down β -arrestin1 (**Fig. 3g**) but had no effect on the pull-down of clathrin, which is known to interact at β 2-adaptin sites (the hinge region and the ear β -sandwich subdomain) that is distinct from the interaction site of β -arrestin. Taken together, these results indicate that Barbadin selectively blocks the interaction between β -arrestin and β 2-adaptin as predicted by the *in silico* docking and the BRET-based assays.

Barbadin inhibits the β -arrestin/AP2-dependent GPCR endocytosis

Because the interaction between β -arrestins and β 2-adaptin is important for initiating receptor internalization, we next sought to determine whether Barbadin could be used as a pharmacological tool, to block the ligand-promoted endocytosis of GPCRs. For this purpose, we used enhanced bystander BRET (ebBRET) trafficking sensors allowing to monitor both receptor disappearance from the plasma membrane (CAAX-rGFP sensor, **Fig. 4a**) and their accumulation in early endosomes (FYVE-rGFP, **Fig. 4e**) in spectrometric and microscopy-based assays²⁶. As shown in **Fig 4a-h**, Barbadin blocked the time-dependent agonist-induced loss of V2R, β 2AR, and AT1R from the cell surface (**Fig. 4b-d**), and consequently prevented their appearance into early endosomes (**Fig. 4f-h**), demonstrating that it acts as an efficient endocytosis inhibitor. Notably, the IC_{50} for the inhibitory action of Barbadin on endocytosis are similar to those observed for its action on the β -arrestin/AP2 interaction (**Fig. 2c and Supplementary Fig. 2a**), consistent with its mode of action (**Supplementary Fig. 5a-h**). The effect of Barbadin on endocytosis was further confirmed using BRET-microscopy allowing to image receptor localization at the plasma membrane (**Fig. 4i and Supplementary Fig. 5i**), and in early endosomes (**Supplementary Fig. 5j**), coherent with the spectrometric measurements (**Fig. 4b-d,f-h**).

To orthogonally validate the BRET-based endocytosis measurements, we used flow-cytometry (FACS) with double-tagged receptors where a HA epitope and a Venus fluorescent protein (vYFP) are fused to amino- and carboxy-termini respectively, allowing to monitor both cell surface (HA immunofluorescence) and total receptor (vYFP fluorescence) expression²⁷. As

shown in **Fig. 5a-c**, agonist stimulation of cells expressing either the V2R or β 2AR led to a time-dependent disappearance of cell surface signals corresponding to agonist-promoted endocytosis. Barbadin significantly inhibited FACS-monitored endocytosis to extents comparable to Pitstop2 and Dyngo-4a, two known inhibitors of both clathrin-dependent and independent endocytosis^{28,29,30} (**Fig. 5a-c**). Since both β 2AR and V2R are known to undergo β -arrestin and β 2-adaptin-dependent endocytosis, the effect of Barbadin on agonist-promoted endocytosis is likely explained by the inhibitory action of Barbadin on the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction. To further validate this mode of action, we used the type A endothelin receptor (ET_{AR}) that undergoes β -arrestin-dependent but clathrin-independent endocytosis into caveolae³¹, and which involves the recruitment of β -arrestin to the receptor without engagement of AP2²⁴. As predicted from its proposed mode of action, Barbadin did not inhibit endothelin-promoted ET_{AR} endocytosis (**Fig. 5d**). In contrast, Pitstop2 significantly blocked agonist-stimulated ET_{AR} endocytosis consistent with its clathrin-independent action²⁹. To further assess Barbadin selectivity, we tested its effect on transferrin endocytosis occurring through clathrin-coated pits and involving the transferrin receptor (TfR), a non-GPCR that interacts directly with AP2 independently of β -arrestin³². Barbadin did not significantly inhibit the internalization of transferrin at any of the time points examined, whereas it was blocked by Pitstop2 as early as 2 minutes after stimulation (**Fig. 5e,f**). The ability of Barbadin to block the endocytosis of natively expressed GPCR was also confirmed by monitoring the agonist-promoted loss of AT1R from cell surface using radio-ligand binding in vascular smooth muscle cells (**Supplementary Fig. 6**). Taken together, these results indicate that Barbadin is a suitable tool to study β -arrestin/AP2 dependent endocytosis.

To gain insight on the inhibitory properties of Barbadin on clathrin-mediated internalization of GPCRs, we next examined the sub-cellular distribution of β -arrestin, AP2 and clathrin by confocal fluorescence microscopy in V2R-expressing cells (lacking endogenous β 2-adaptin to facilitate the incorporation of CCPs-labeled β 2-adaptin into AP2 complexes, **Supplementary Fig. 7a**) transfected with β -arrestin2-mCherry, β 2-adaptin-CFP and clathrin-light-chain-YFP. As shown in **Fig. 6a**, under basal conditions β 2-adaptin and clathrin colocalized in CCPs, whereas β -arrestin is diffuse in the cytosol. Upon AVP stimulation, β -arrestin translocates to CCPs where it colocalizes with β 2-adaptin and clathrin. A pre-treatment of 30 min with Barbadin did not disrupt the CCPs nor prevented the translocation of β -arrestin to pits (**Fig. 6b**). In fact, Barbadin led to an increase in β -arrestin/ β 2-adaptin colocalization (**Supplementary Fig. 7b,c**) that was even more evident upon longer agonist stimulation (**Fig. 6c,d**). The maintenance of the CCPs integrity upon Barbadin treatment is consistent with our previous biochemical data showing that Barbadin has no significant effect on the binding of clathrin to β 2-adaptin (**Fig. 3g**). The observation that β -arrestin translocation to the plasma membrane is not inhibited by Barbadin is also in agreement with our BRET data demonstrating that Barbadin does not interfere with the recruitment of β -arrestin to V2R (**Fig. 3e**) or β 2AR (**Supplementary Fig. 4b**). Although, the lack of obvious inhibition of β -arrestin and β 2-adaptin colocalization by Barbadin appears counter-intuitive considering it blocks the interaction between these two proteins, the localization of β -arrestin to the pits does not result exclusively from its interaction with β 2-adaptin. Indeed, many other protein-protein interactions have been implicated in stabilizing GPCR/ β -arrestin complexes at the PM and into CCPs, including direct binding of β -arrestin's N-terminal domain³³ to the μ -subunit of AP2 and an indirect clathrin-mediated link between

AP2 and β -arrestin's C-terminal domain^{34, 35}. Therefore, the persistence of β -arrestin in CCPs and its colocalization with AP2 in presence of Barbadin most likely reflects β -arrestin's ability to directly interact with other components of the CCPs in particular clathrin itself bringing it in close proximity to β 2-adaptin, resulting in colocalization, without a direct interaction. To further test this possibility, we took advantage of a mutant form of β -arrestin lacking the major site of interaction with clathrin (β -arrestin2- Δ Clath). As shown in **Supplementary Fig. 7d**, although β -arrestin2- Δ Clath was still recruited into CCPs, where it largely colocalized with β 2-adaptin upon AVP stimulation, Barbadin treatment resulted in a marked reduction of β -arrestin2- Δ Clath clustering in these CCPs as can be seen by its more diffuse distribution at, or near, the PM, and the reduced colocalization of the mutant β -arrestin with β 2-adaptin. These findings are consistent with the notion that even though the interaction between β -arrestin and AP2 plays a critical role for clustering receptor/ β -arrestin complexes in CCPs, other interactions such as the ones with clathrin are also important, and that inhibiting only one of them is insufficient to prevent its targeting to CCPs. Yet, Barbadin clearly inhibited the traffic of β -arrestin from the plasma membrane to endosomes that is seen upon sustained agonist stimulation of receptor (**Fig. 6c**). This suggests that destabilizing the interaction between the β 2-adaptin and β -arrestin with Barbadin delays CCPs-mediated internalization kinesis.

Barbadin modulates GPCR signaling

Several studies have suggested a role for β -arrestin and/or endocytosis in downstream signaling. Since Barbadin blocks β -arrestin/ β 2-adaptin interaction and the subsequent endocytosis without affecting the recruitment of β -arrestin to the receptor (**Fig. 3d**), it represents a unique tool to

selectively assess the role of β -arrestin- β 2-adaptin-dependent endocytosis in signaling. Given that β -arrestin-mediated endocytosis has been proposed to contribute to the activation of the MAPK by many GPCRs^{36, 37} including the V2R for which the ERK1/2 activation in HEK293 cells is entirely β arr-dependent³⁸, we assessed the effect of Barbadin on the V2R-stimulated ERK1/2 activity. As shown in **Fig. 7a,c**, Barbadin completely blocked the AVP-stimulated ERK1/2 activation. This effect was selective since Barbadin did not block EGF-stimulated ERK1/2 (**Fig. 7b,c**). These data indicate that the engagement of β 2-adaptin by β -arrestin is essential for the β -arrestin-dependent activation of ERK1/2 by V2R and are consistent with a role for endocytosis in this signaling cascade. When considering the G-protein-dependent signaling cascades such as the activation of adenylyl cyclase, the β -arrestin-promoted endocytosis has been proposed to contribute both to the desensitization-resensitization cycle^{2, 39} as well as sustained endosomal Gs signaling^{11, 12, 13}. As shown in **Fig. 7d,e**, Barbadin significantly blunted the time-dependent increase in cAMP production promoted by the agonist stimulation of either V2R or β 2AR. This effect was concentration-dependent yielding an IC₅₀ of $\sim 7.9 \mu\text{M}$ (**Fig. 7g,h**) which is consistent with the potency of Barbadin to inhibit the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction (**Fig. 2c**). The selectivity of action is confirmed by the lack of effect of Barbadin on the forskolin-stimulated cAMP production (**Fig. 7i**) or the activation of Gs as measured by BRET⁴⁰ (**Fig. 7f**). Such inhibition of the β 2AR-stimulated cAMP production could result from the lack of recycling of resensitized receptor to the plasma membrane that normally follows endocytosis. However, the latter explanation is unlikely because, in contrast to β 2AR, V2R does not recycle back to the plasma membrane following endocytosis, and therefore this process would not contribute to the inhibition of V2R-stimulated cAMP

production observed here. These results therefore indicate, as was recently suggested for some receptors, that inhibition of endocytosis may prevent the adenylyl cyclase signaling that persists following endocytosis^{11, 12}.

DISCUSSION

The present study led to the identification of the first chemical probe that specifically inhibits the interaction between β -arrestin and the β 2-adaptin subunit of AP2. We validated the important role of this interaction for receptor endocytosis by demonstrating that Barbadin blunts clathrin-mediated endocytosis of three prototypical GPCRs (β 2AR, V2R and AT1R) without interfering with the translocation of β -arrestin to the receptor, nor with the interaction of AP2 with other components of the endocytic machinery. When used to dissect the role of the β -arrestin/AP2 interaction in GPCR signaling, Barbadin was found to inhibit the activation of ERK and cAMP production elicited by receptor stimulation, demonstrating that the β -arrestin/AP2 complex plays a role not only in receptor trafficking but also in signaling.

This work also illustrates that virtual screening can successfully identify small molecule inhibitors of protein-protein interactions. Despite the fact that identifying protein-protein interface inhibitors remains challenging due to the large surfaces of these interfaces and their planar architecture, a number of successes have now been reported for protein complexes bearing favorable quaternary architectures^{41, 42}. In this context, the fact that the groove delineating the β -arrestin binding site on the β 2-adaptin ear platform subdomain is well-defined^{19, 20} undoubtedly contributed to conduct reliable docking calculations that led to the identification of a validated inhibitor.

The docking pose and thermal-shift assay experiments suggest that Barbadin binds directly to the platform domain of β 2-adaptin and relies on residues that are also involved in the interaction

with β -arrestins. Indeed, the role of the benzyl-phenyl moiety of Barbadin in mimicking Phe388 and Phe391 of β -arrestin for binding β 2-adaptin, is supported by the observations that analogues lacking one of the two phenyl ring (analogues A, B and compound 43) or altering the distance and flexibility between these rings (analogue C) showed lower inhibitory action on the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction. Consistent with such a mode of binding that competes for the binding of β -arrestin C-tail to the platform domain of β 2-adaptin, Barbadin inhibited the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin in a reversible manner without affecting the recruitment of β -arrestin to the receptor. Such selectivity may not be surprising given that the targeted domain of interaction between AP2 and β -arrestin is remote from the polar core of β -arrestin that interacts with the receptors^{16, 43}. Furthermore, as the engagement of AP2 by β -arrestin follows the recruitment of β -arrestin to the receptors²⁴, blocking AP2 binding would not be predicted to influence the initial β -arrestin binding to the receptor. The topologically driven selectivity of Barbadin is also illustrated by its lack of effect on the interaction between β 2-adaptin and other components of the CCPs such as clathrin and Epsin, which bind distinct sites on β 2-adaptin compared with β -arrestin. Consistent with the selectivity of Barbadin, the formation of CCPs is not disturbed as demonstrated by co-localization of AP2 and clathrin.

As predicted by its inhibitory action on the β -arrestin/ β 2-adaptin interaction, Barbadin significantly inhibited receptor endocytosis as quantified by flow-cytometry and BRET, and imaged by fluorescence microscopy experiments monitoring V2R and β -arrestin cell surface localization. Although Barbadin did not affect the recruitment of β -arrestin to the plasma membrane upon V2R stimulation, it prevented its subsequent trafficking to endosomes. This

inhibition resulted in a large fraction of the β -arrestin accumulating at the cell surface and co-localizing with AP2 and clathrin in CCPs. This finding suggests that the β -arrestin-dependent accumulation of V2R-cargo into forming CCPs is a multi-step process involving numerous interactions with structural and endocytic accessory proteins of the coat (**Fig. 8**). Interestingly, it also suggests that β -arrestin interaction with β 2-adaptin is essential in the maturation of clathrin-coated vesicle-mediated internalization (*e.g.* accumulation of the V2R/ β -arrestin complex into clathrin-coated vesicles at plasma membrane and their final invagination). In that respect, the effect of Barbadin is reminiscent of the expression of an AP2 complex lacking the appendage domain of α -adaptin—which like the β -appendage that binds β -arrestin for initiating GPCR endocytosis, also recruits other regulatory/accessory proteins on its platform domain for the internalization of other classes of receptors —where it prevented the maturing and invagination of CCPs^{13,44}. The fact that Barbadin did not prevent the clustering of receptor/ β -arrestin complexes in CCPs is not unexpected (**Fig. 6a-c**), considering that β -arrestin also forms low affinity interactions with clathrin through its carboxy-tail⁴⁵, and with AP2 via its μ 2 subunit through β -arrestin's N-terminal domain⁴⁶. Indeed, when preventing the former interaction, the inhibitory effect of Barbadin for clustering receptor/ β -arrestin complexes in CCPs was more readily observed. The robust Barbadin-promoted inhibition of both agonist-promoted BRET between β 2-adaptin-YFP and β -arrestin-RlucII, as well as endocytosis for the β 2AR, V2R and AT1R support previous observations demonstrating that the interaction between the carboxyl tail of β -arrestin and the β 2-adaptin subunit of AP2 is preponderant in the initial steps of agonist-promoted internalization of many GPCRs¹⁷. The selective action of Barbadin on endocytosis processes mediated by the β -arrestin/AP2 complex was supported by its lack of effect on the

ligand-independent and ligand-promoted internalization of transferrin and endothelin-1 receptors, respectively, which are β -arrestin- and AP2-independent^{24, 31, 32}. The demonstration that Barbadin blocks receptor endocytosis, not only in engineered cells heterologously expressing GPCRs but also in vascular smooth cells endogenously expressing AT1R, paves the way for its use to assess the role of the β -arrestin/ β 2-adaptin complexes in native systems.

The observed effects of Barbadin on the ERK1/2 and cAMP signaling activities of the receptors confirm the role played by endocytosis in the control of specific GPCR signaling modalities^{9, 11, 12} and more particularly unambiguously demonstrate the essential, but perhaps underappreciated, role of the β -arrestin/AP2 interaction in this process. Barbadin completely blocks the V2R-stimulated ERK1/2 activation confirming the role of β -arrestin in this signaling pathway for V2R³⁸, but the result also points to a central role of endocytosis- and CCPs-mediated activation of MAPK by the receptor/ β -arrestin complex. This finding is consistent with the emerging role of β -arrestin in CCPs for MAPK signaling, which was described for the Bradykinin B2 receptor and recently shown for the β 1-adrenergic receptor^{47, 48}. Thus, inhibition of β -arrestin signaling in both CCPs and endosomes (because Barbadin prevented the trafficking of receptor/ β -arrestin complexes to these intracellular compartments) most likely contributes to the total blockade of V2R-mediated activation of ERK1/2 by Barbadin. This inhibitory action of Barbadin on ERK1/2 activation cannot be attributed to a non-specific off-target effect of the compound, on other components of the MAPK pathway since it did not affect ERK1/2 activation promoted by the EGF receptor. These results are therefore consistent with the notion that spatio-

temporal GPCR-stimulated ERK1/2 activation occurs following clustering of receptor/ β -arrestin in CCPs and endocytosis of the complex in endosomes^{9, 49}.

The effect of Barbadin on the cAMP production stimulated by both β 2AR and V2R also provide new insights on the spatio-temporal regulation of signaling as it brings strong support to the emerging notion that GPCR-stimulated cAMP production continues after endocytosis of Gs-coupled receptors^{13, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56}, contrasting with the classical view that receptor endocytosis contributes only to the termination of cAMP signaling. Sustained interaction between receptor and β -arrestin at the plasma membrane upon inhibition of endocytosis could also directly contribute to the reduced cAMP accumulation by preventing reactivation of the receptor at the plasma membrane. The effect was specific to receptor-mediated cAMP production and did not result from an off-target effect on Gs or the adenylyl cyclase since Barbadin had no effect on the Gs activity as directly monitored by BRET or cAMP generation resulting from a direct activation of adenylyl-cyclase by forskolin. The extension of endocytosis-dependent cAMP production to the V2R is particularly interesting given the fact that this receptor does not recycle to the plasma membrane following endocytosis but is instead retained for extended period of time in endosomal compartments before being targeted for degradation⁵⁷. This result excludes the possibility that the diminution of V2R-promoted cAMP production following Barbadin treatment could result from the accumulation of desensitized receptor at the plasma membrane that cannot be replaced by re-sensitized ones upon inhibition of endocytosis.

Barbadin is distinct from the existing endocytosis blockers as it selectively interferes with the β 2-adaptin/ β -arrestin interaction and thus solely blocks endocytic processes that are dependent

on the interaction between β -arrestin and the appendage domain of the β -subunit of AP2. Existing pharmacological inhibitors such as dynasore⁵⁸, dynoles⁵⁹, or dyngos³⁰ inhibit all dynamin-dependent endocytic pathways, while pitstop1/2²⁸ inhibit both clathrin-dependent and -independent endocytosis²⁹. Although we cannot rule out the possibility that Barbadin interacts with other targets in cells, we found that it did not directly act on other components of the clathrin endocytic machinery, nor on important signaling effectors (e.g. β -arrestin- and G protein-dependent signaling promoted by GPCRs, cAMP production by adenylyl-cyclase, and MAPK activation promoted by other receptor like EGFR) supporting a selective mode of action. Barbadin's selectivity of action on β -arrestin/AP2 interaction allows the dissection of the relative contribution of this complex to the regulation of GPCRs endocytosis and signaling, independently of other processes controlling cell surface density, and thus represents a valuable addition to the existing pharmacological toolbox⁶⁰.

METHODS

Materials

DMEM, FBS, penicillin, streptomycin, PBS and G418 were from Wisent Inc. Cell culture plates and dishes were purchased from BD Biosciences. Arginine vasopressin (AVP), isoproterenol (ISO), Angiotensin II (AngII), Epidermal Growth Factor (EGF), endothelin 1 (ET1), sigmacote, poly-L-ornithine hydrobromide, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Triton X-100, mouse monoclonal anti- β_1 - and β_2 -adaptins (AP1/2, clone 100/1, #A4450), rabbit Anti-Flag antibody (#F7425), anti-Flag (M2, #F3165) and anti-mouse or anti-rabbit HRP conjugated antibodies (#A9044 and #A9169, respectively) were from Sigma-Aldrich. Poly-d-lysine was obtained from MatTek Corporation. Linear polyethylenimine 25-kDa (PEI) was from Polysciences. BARR3978 antibody against β -arrestin was previously described⁶¹. Phospho-p42/p44 (pERK1/2, #9106) and p42/p44 (ERK1/2, #9102) antibodies were from Cell Signaling Technology. Antibodies against clathrin heavy chain (Clone 23, 610499) and Adaptin β (Clone 74, #610381) were obtained from BD Biosciences.. Epsin1/2 rabbit antibody was kindly provided by Peter McPherson (McGill University). Dithiobis succinimidyl propionate (DSP) was from Pierce. Coelenterazine H, coelenterazine 400A and Prolume Purple were from Nanolight Technology. Mouse monoclonal anti-HA antibody (HA.11) was purchased from Covance (#MMS-101P). Anti-mouse Alexa Fluor 647 secondary antibody (A-21463), fluorescent transferrin conjugate (Alexa Fluor 633, T23362), puromycin and salmon sperm DNA were bought from Invitrogen. Pitstop2 was from Abcam (ab120687) and Dyngo (S7163) from SelleckChem. cAMP dynamic-2 kit was from Cisbio. Costar v-bottom polypropylene 96-well plates were from Corning. White Optiplate 96-well microplates and 384-well Proxiplates

were purchased from PerkinElmer. Lumitrac 200 384-well plates were from Greiner Bio-one. X-treme GENE HP reagent was from Roche and Strep-Tactin Sepharose beads from IBA GmbH. β -arrestin1 C-terminal peptide (sequence: DDDIVFEDFARQLKGMKDD) was synthesised by Genscript while CPM dye was purchased from ThermoFisher Scientific. Protein concentration were determined using a detergent compatible protein assay kit from Bio-Rad. Differential scanning fluorimetry was done in a RotorGeneQ from Qiagen. Luminescence and BRET reading were performed in the Mithras LB 940 multidetector plate reader from Berthold Technologies. Cell surface expression of receptors was analyzed in a LSR II flow cytometer from BD Biosciences. Radioactivity was counted using a PerkinElmer Wizard 1470 automatic γ -counter. For microscopy, colocalization analyses were performed using Zen software from Zeiss. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer was read in an Artemis plate reader from Cosmo Bio USA.

Virtual screening

Virtual screening by docking has been performed on a computer cluster of 10 Intel Core 2 Quad 2.6 GHz processors. The SD file of the Myriascreen compounds collection (library number T990000) has been requested to Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Canonicalization and three-dimensional coordinates generation of the compounds were performed using Chemaxon Standardizer, JChem 5.1.2 (www.chemaxon.com). Starting from the β 2-adaptin/ β -arrestin co-crystal structure (PDB entry 2IV8), the AutoDockTools⁶² interface was used to prepare the binding site of β 2-adaptin which was defined as a 30-Å cubic box centered on the β -arrestin helical peptide bound to the β 2-adaptin ear platform subdomain. Docking was carried out using Autodock 4.0⁶² with 30 independent runs of simulation per compound docked. Autodock

scoring function was used to rank compounds by lowest energy. For visual inspection of the best energy candidates, we chose to select any compounds within a range of 2.1 kcal/mol (standard error of Autodock) from the best compound. The best 196 selected compounds, and the docked Barbadin analogues were visually analyzed using PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4 Schrödinger, LLC) and the MOE package (Molecular Operating Environment (MOE), 2012.10, Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2012).

Compounds acquisition and technical consideration

The 52 small organic compounds from the original screen were purchased from Sigma. Because Barbadin was later discontinued by Sigma, it was then acquired from Otava (#0129700278). Barbadin analogues were acquired from Enamine (see **Supplementary Table 1** for catalog numbers). All compounds were solubilized in 100% DMSO at a 10 mM stock concentration. To circumvent the possibility that Barbadin adheres to plastic, all assays were carried out using tips, tubes and 96-well plates coated with Sigmacote, then rinsed extensively with water.

Plasmids and constructs

Plasmids encoding myc-V2R⁶³, V2R-YFP⁶³, HA-ETaR⁶⁴, HA-AT1R⁶⁵, β -arrestin1-RlucII⁶⁵, β -arrestin2-RlucII⁶⁶, β -arrestin2-YFP⁶⁷, β -arrestin2-mCherry⁶⁵, β 2-adaptin-YFP⁶⁸, GST- β 2-adaptin(592-937)¹⁹, flag- β -arrestin1⁶, β 2AR-RLucII²⁶, V2R-RLucII²⁶, AT1R-RLucII²⁶, rGFP-CAAX²⁶ and rGFP-FYVE²⁶ were previously described. β 2-adaptin-mCherry was generated by replacing the YFP moiety of β 2-adaptin-YFP with that of the mCherry using the AgeI and BsrGI sites. β 2-adaptin-CFP was generated by replacing the YFP moiety of β 2-adaptin-YFP with that

of the CFP from the pECFP vector. Clathrin light chain-YFP was purchased from addgene (Cambridge, MA). The LIEF/AAEA substitution in human β -arrestin2-YFP (β -arr2- Δ Clath-YFP) was generated by complementation PCR reaction, using the forward primer 5-GGACACCAACGCAGCTGAAGCCGATACCAACTATGCC-3 with the reverse 5-TGGCGACCGGTGGATCCCGGCAGAGTTGATCATCATAGTCG-3 primer containing the BamHI site, and the reversed primer 5-TCGGCTTCAGCTGCGTTGGTGTCCACAGGGACATC-3 and forward primer 5-AGATCTCGAGCTCAAGCTTATGGGGGAGAAAC-3 containing the HindIII site. The PCR product from the amplified complementing fragments was cloned into BamHI/ HindIII sites by Gibson assembly (NEB). The β 2AR construct was generated by inserting a polymerase chain reaction (PCR)-amplified fragment encoding human β 2AR into a pcDNA3.1 vector, between HindIII/XbaI. The β 2-adaptin(700-937)-StrepTagII construct was generated by inserting a PCR-amplified fragment encoding human β 2-adaptin (residues from 700 to 937) into a pRSETA vector (Invitrogen), between the BamHI and Acc65I restriction sites. To generate HA- β 2AR-Venus encoding plasmid, the Venus sequence was first PCR-amplified and introduced into the previously described pIRESP-HA vector⁶⁹. Then, the β 2AR sequence was PCR-amplified and inserted into pIRESP-HA-Venus vector by recombination using In-Fusion PCR Cloning Kit from Clontech (Mountain View, CA). The HA- β 2AR-Venus stable cell line was generated by transfecting pIRESP-HA- β 2AR-Venus in HEK293T followed by polyclonal selection of expressing cells using 3 μ g/ml of puromycin. The expression vectors pIREShygro3 and pIRESpuro3 were from Clontech (Mountain View, CA). The plasmid encoding HA-V2R-Venus was made in two cloning steps. First, HA-V2R gene was PCR-amplified from pcDNA3.1(+)₃HA-V2R plasmid from Missouri S&T cDNA resource center (Rolla, MO),

keeping one HA tag and removing the stop codon. The PCR product was then inserted in pIRESpuro3a vector. Then, the Venus sequence was PCR-amplified and inserted in pIRESpuro3a-HA-V2R. The resulting HA-V2R-Venus fusion sequence was then inserted into pIRESHygro3 vector, yielding pIRESHygro3-HA-V2R-Venus plasmid. The HA-V2R-Venus stable cell line was generated by transfecting pIRESHygro3-HA-V2R-Venus in HEK293T followed by polyclonal selection of expressing cells using 100 µg/mL of hygromycin B. All constructs were verified by DNA sequencing.

β2-adaptin deletion in HEK293 cells (CRISPR-β2Ad) were generated using the CRISPR/Cas9 system PspCas9(BB)-2A-Puro (Px459v2) vector (Gift from Feng Zhang: Addgene plasmid #62988)⁷⁰ and the gRNA target sequences (5'-GTATTTCAACAACCAATAAAAA-3' and 5'-GGTCTGGCTACCTGCAGTAA-3') against the human AP2B1 gene (GenScript gRNA database). Each gRNA was cloned into the Px459v2 vector, and both constructs were transfected in HEK293 cells using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. The next day, medium supplemented with puromycin (2 µg/ml) was added to cells for 48 h and cells were serially diluted and plated in 96-well plates for generating individual colonies. Colonies were then verified for β2-adaptin expression by western blot and by PCR genotyping using primers flanking the deleted region. Positive clone #5 (hereafter named CRISPR-β2Ad-LY5 cells) was selected.

Cell culture

HEK293T is the cell line in which BRET-based biosensors have been developed in Dr. Bouvier's laboratory and this cell line was used for all the BRET and FACS experiments. HEK293SL are a subclone derived from regular HEK293 cells (Ad5 transformed) and were

selected in Dr. Laporte's laboratory. These cells have a cobblestone appearance and a better adherence as compared with regular HEK293T cells, making them more amenable to microscopy. HeLa is a cell line expressing a higher level of native TfR, compared to HEK293T cells, and were consequently used for monitoring TfR expression by FACS. HEK293T, HEK293SL and HeLa cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin and streptomycin and incubated at 37 °C in 5% CO₂.

Primary rat aortic VSMCs were a gift from Dr. Marc Servant (Université de Montreal) and were used for endogenous AT1R internalization assay. These cells were grown in DMEM/high glucose supplemented with sodium pyruvate, 10% FBS, and 20 mg/ml gentamycin.

All cells were regularly tested for mycoplasma contamination (PCR Mycoplasma Detection kit, abm, BC, Canada).

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays

HEK293T cells stably expressing β 2-adaptin-YFP²⁴ were cultured as aforementioned with the addition of G418 in the supplemented DMEM. Forty-eight hours before the experiments, 10 μ g of total DNA (adjusted with salmon sperm DNA) was used to transfect 6x10⁶ cells/mL in 10-cm dishes using 25-kDa linear PEI as a transfecting agent (3:1 PEI/DNA ratio). Cells stably expressing β 2-adaptin-YFP were transfected with either 250 ng of V2R, or 2.5 μ g of β 2AR, or 3.0 μ g of AT1R and with either 100 ng of β -arrestin1-RlucII, or β -arrestin2-RlucII for the compounds screen, the concentration-response curves, the one-point stimulation experiments, as well as for the kinetics that monitors the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin. To monitor β -arrestin recruitment to either V2R or β 2AR, HEK293T cells were transfected with 5 μ g of V2R-YFP or 3 μ g of β 2AR-YFP and 500 ng of β -arrestin1-RLucII or 120 ng of β -

arrestin2-RLucII. For the pre-screen experiment assessing compounds interference with BRET signals, HEK293T cells were transfected with 100 ng of β -arrestin1-RLucII. On the day of the BRET experiment, cells were washed, detached, and resuspended in Tyrode's buffer. Cells (10^5 cells/well) were distributed in 96-well microplates. DMSO or compounds selected from the virtual screening were preincubated for 30 minutes at indicated concentrations, always keeping DMSO at 1% final concentration in each well. Cells were treated with AVP or ISO at the indicated times and concentrations, at room temperature. Coelenterazine H (for YFP BRET acceptor) or coelenterazine 400A (for GFP10 BRET acceptor) was added at a final concentration of 2.5 μ M five minutes before measurements. Readings were collected with a Mithras LB 940 multidetector plate reader (Berthold Technologies) to integrate signals detected in the 485/20 nm and 530/25 nm windows for the Renilla luciferase (RlucII) and YFP light emissions, respectively, and in the 400/70 nm and 515/25 nm windows for the RlucII and GFP10 light emissions, respectively. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light intensity emitted by the YFP or GFP10 over the light intensity emitted by the RlucII. Net BRET values were obtained by subtracting the background BRET signals detected when RlucII was expressed alone. Ligand-promoted BRET was calculated by subtracting the BRET ratio obtained in the absence of agonist from the BRET ratio detected in its presence.

BRET imaging

HEK293SL cells seeded on poly-d-lysine-coated glass-bottom 35-mm culture dishes were transfected with 100 to 200 ng per dish of AT1R-RlucII or V2R-RlucII, respectively, with either 400 ng per dish of rGFP-CAAX or 300 ng per dish of rGFP-FYVE, using X-treme GENE HP reagent (Roche). Two days post transfection, cells were washed once with 1 ml of modified

Hank's balanced salt solution (138 mM NaCl, 5.33 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 4.16 mM NaHCO₃, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) and set on the microscope. BRET images were obtained using Nikon Ti-U microscope equipped with × 60 objective (Apochromat TIRF, NA 1.49, Nikon) and EMCCD camera (EM N2 1024, Nüvü Cameras) with filter changer (Lambda 10-2, Sutter instrument). Prolume Purple (final concentration of 10 μM) was added and images were obtained using photon counting feature of the camera. The exposure time of each image was 200 msec. Images were obtained with or without a filter corresponding to the BRET acceptor (480LP) wavelength. The filter was switched after taking every 50 images, and the final image was obtained by integrating successive 500 images applying the same filter to the camera. BRET ratio images were generated using pixel arithmetic functions of MetaMorph software version 7.8 (Molecular Devices) as follows: Pixel hue: BRET level calculated by dividing the counts of acceptor luminescence images with total luminescence images, and allocated to default rainbow hue (lowest in purple and highest in red); pixel brightness: the value of donor images with auto brightness.

Protein purification

Plasmid for β2-adaptin(700-937)-StrepTagII was transformed in E.coli BL21 pLysS cells that were then grown at 37°C in TB medium containing 100 μg/mL ampicillin and 50 μg/mL chloramphenicol to an absorbance at λ = 600 nm (A₆₀₀) of 0.6. Protein expression was induced with 0.2 mM IPTG and cells were grown overnight at 30°C. Pelleted cells were resuspended in lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mg / ml lysozyme, 5 % glycerol, PMSF 0.5 mM, TCEP 50 μM and 1 mM EDTA) and frozen at -80°C. For purification, cells

were thawed and lysed by mild sonication. After cell debris removal by centrifugation, lysates were incubated with rinsed Strep-Tactin Sepharose beads (IBA) at 4°C for one hour on a rotator. The protein was subsequently eluted and purified further by passage over a sepharose column (Bio-Rad) and a gel filtration column. Protein was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for long-term storage.

Differential scanning fluorimetry assay

The thermal denaturation of β 2-adaptin (residues 700-937, molecular weight 26.88 kDa) was monitored by CPM (7-Diethylamino-3-(4'-Maleimidylphenyl)-4-Methylcoumarin) dye fluorescence changes upon conjugation to the cysteines of β 2-adaptin that become exposed upon unfolding. The amount of 2.1 μ g purified β 2-adaptin was diluted in 100 μ l final volume using phosphate buffered saline (PBS) to the concentration of 0.78 μ M. Samples containing 0.5 mM Triton X-100 were incubated for 30 min without Barbadin (DMSO), with 10 μ M, 33 μ M or 100 μ M Barbadin, or with 20 μ M β -arrestin1 C-terminal peptide (sequence: DDDIVFEDFARQLKGMKDD), synthesised by Genscript, USA) before the addition of CPM dye (ThermoFisher Scientific, Switzerland). Three mg/ml CPM dye in DMSO was diluted 1:80 in PBS and 10 μ l of the dilution was added to each sample to a final concentration of 9.3 μ M. Each sample was split into three 25 μ l aliquots. The samples were then heated from 30°C to 90°C at 6°C/min in a RotorGeneQ and the fluorescence of the CPM dye was monitored using 365 nm excitation and 460 nm emission. RotorGeneQ Series Software was used for data analysis. The first derivative of the fluorescence data was used to determine the melting temperatures.

Flow cytometry for assessing receptor cell surface expression

For monitoring V2R and β 2AR cell surface expression, HEK293T cells stably expressing either HA-V2R-Venus or HA- β 2AR-Venus were seeded in 150mm dishes. For monitoring ET_AR cell surface expression, HEK293T cells were transfected with HA-ET_AR in 100 mm dishes, using the PEI procedure previously described in the methods. Forty-eight hours later, cells were harvested, rinsed with PBS, then detached and resuspended in Tyrode's buffer. Cells (1×10^6 cells/well) were distributed in v-bottom 96-well plates. DMSO, Barbadin (100 μ M), Pitstop2 (100 μ M) and Dynngo-3a (30 μ M) were preincubated for 30 min (final 1% DMSO content in each well). Cells were treated at room temperature, in the absence or presence of AVP (100 nM), ISO (10 μ M) or ET1 (10 nM) for the indicated times, then put on ice for the rest of the experiment. Plates were quickly spun at 4 °C and supernatant from each well was removed using a vacuum line. Cells were resuspended in Tyrode supplemented with 1% BSA (Tyrode/BSA) containing mouse monoclonal anti-HA antibody (1:1000) to label cell surface receptors. After 20 min incubation, plates were quickly spun then resuspended in Tyrode/BSA containing anti-mouse Alexa Fluor 647 secondary antibody (1:1000). After 30 min incubation and protected from light, plates were quickly spun, and cells washed and resuspended in Tyrode and kept on ice. Cells were analyzed through a LSR II flow cytometer set to detect YFP and Alexa Fluor 647 nm in distinct channels (Supplementary Fig. 8). For monitoring transferrin receptor surface expression, HeLa cells were seeded in a 150mm dish and incubated for 48 h before being processed. One hour before the experiment, cells were serum starved, then rinsed with PBS and resuspended in Tyrode's buffer. Cells were distributed in centrifuge tubes (500 μ l of resuspension per tube with 1×10^6 cells each). DMSO, Barbadin (100 μ M) or Pitstop2 (100 μ M) were preincubated for 30 min at room temperature, then cells were put on ice for 10 min. Cells were incubated with Alexa Fluor 633-conjugated transferrin (100 μ g/mL) for 30 min at 4 °C in

the dark, rinsed with cold PBS and shifted to 37 °C for 15 min, except for a control tube that was kept on ice. Cells were then pelleted, washed, acid-washed (0.1 M glycine, 150 mM NaCl, pH 3), resuspended in Tyrode containing 1% BSA and analyzed in a LSR II flow cytometer (Alexa Fluor 647 channel).

VSMC internalization assay

[¹²⁵I]-AngII was prepared with the Iodogen method, and specific activity was determined from self-displacement and saturation experiments, as previously described⁶⁵. Receptor internalization was performed as described previously²⁶. Briefly, VSMCs were plated at a density of $\sim 7 \times 10^4$ cells per well in poly-L-ornithine-coated 24-well plates. When cells were confluent (24-48 h after plating), they were starved in DMEM with 20 mM HEPES (DMEM-H) for 2 h prior to Barbadin treatment. Cells were incubated in either DMSO or Barbadin (20 μ M) for 30 min at 37 °C, before adding [¹²⁵I]-AngII (0.2 nM in 0.1% BSA binding buffer) for 15 min at 37 °C. Binding and internalization of [¹²⁵I]-AngII was terminated by rapidly rinsing the cells twice with ice-cold PBS and then either rinsing once with ice-cold PBS to obtain total binding, or with 50 mM acetic acid in 150 mM NaCl (pH 2.7) for 10 min to determine the internalized receptors (acid-resistant). Cells were solubilized in 0.5 M NaOH, 0.05% SDS, and radioactivity was counted using a Wizard 1470 automatic γ -counter. Percent receptor internalization was calculated from the ratio of acid-resistant binding over total binding. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μ M unlabeled AngII.

Fluorescence microscopy

For β -arrestin colocalization with β 2-adaptin experiments, HEK293T stably expressing human V2R cells were seeded in 35mm optical glass-bottom culture dishes with poly-L-lysine. Twenty-four hours later, cells were transfected with 300 ng of β -arrestin2-mCherry, 400 ng of β 2-Adaptin-YFP with pcDNA3.1 for up to 12 μ g of total DNA using conventional calcium phosphate co-precipitation method. For colocalization of β -arrestin2 with β 2-adaptin and clathrin, CRISPR- β 2Ad-LY5 cells were seeded on coverslips coated with poly-Ornithine and transfected with 2 μ g of HA-V2R, 400 ng of β 2-Adaptin-CFP, 300 ng of β -arrestin2-mCherry, 150 ng of clathrin-YFP and pcDNA3.1 for up to 12 μ g of total DNA using lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Media were changed the next day and experiment performed 48 h post-transfection. Cells were serum-starved for 30 min, then pretreated with 10 μ M Barbadin or vehicle (DMSO) for an additional 30 min before stimulation with 1 μ M AVP for 2.5 min. Before mounting coverslips on slides, cells were first washed in PBS, then incubated for 10 min in PBS-containing 4% Paraformaldehyde (PFA, v/v). Images of live cells were collected on a Zeiss LSM-510 Meta laser scanning microscope with a 63x/1.4 oil objective lens using excitation/emission filter sets: 543 nm/560 nm (Long Pass) for mRFP, and 514 nm/530-600 nm (Band Pass) for YFP. Images of fixed cells were collected on a Zeiss LSM-780-NLO laser scanning microscope with a 63x/1.4 oil DIC M27 objective lens using 543 nm, 514 nm, and 458 nm for mCherry, YFP and CFP excitation, and a GaAsP spectrum detector set at 588-695 nm, 517-580 nm and 464-517 nm, respectively. Colocalization analysis was performed using regions of interest (ROI) and analyzed using Zen software.

GST-pulldown assays

Plasmid DNA for GST and GST- β 2-adaptin(592-937) were transformed in *E. coli* BL21 cells. Overnight cultures were grown in super-broth medium supplemented with ampicillin (100 μ g/ml), diluted to an A_{600} of 0.4 in the same medium and grown for another 1 h 30 at 37°C to reach an A_{600} of 0.8 (log phase). Cultured cells were then induced with 0.1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 5 h at 30°C. Cells were then pelleted, washed once with PBS and resuspended in PBS containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 mg/ml lysozyme and incubated for 15 min on ice. Cells were lysed by immediately adding Triton X-100 (1 % v/v) followed by two freeze-thaw cycles in liquid nitrogen. Solubilized cells were sonicated (3 x 15 sec) on ice and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Glutathione-sepharose beads were added to the supernatant and gently shaken at 4°C for 2 h. Beads were washed three times with cold PBS containing 1% Triton X-100, then three times with cold PBS. Protein concentration was determined using a detergent compatible protein assay kit, and the integrity of the fusion proteins was analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and by Coomassie staining. To prepare cell lysate, HEK293T (1.2×10^6) were plated in 100 mm dishes and transfected 24 hours later with 5 μ g of Flag- β -arrestin1 and pcDNA3.1 (to a total of 12 μ g) using conventional calcium phosphate co-precipitation method. After overnight incubation, transfection medium was replaced with fresh MEM. Twenty-four hours later, cells were washed with PBS and lysed in a glycerol buffer containing 1 mM PMSF, 25 μ g/ml leupeptin, 2.5 μ g/ml aprotinin and 1 mM pepstatin. Cell lysates were cleared by centrifugation (14,000 rpm for 15 min). Seven micrograms of GST or GST- β 2-adaptin(592-937) were incubated for 1 h at RT with or without Barbadin (200 μ M) in 100 μ l PBS, then 100 μ l of cell lysate was added and left 2 h at 4°C on a Nutator. Beads were spun and washed 5 times in glycerol buffer and resuspended in SDS sample buffer (8 % SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 6.5, 10 % glycerol, 5 % 2-

mercaptoethanol, 0.003 % bromophenol blue). Proteins were resolved by electrophoresis on a 10 % gel, transferred onto nitrocellulose, and analyzed by western blot using mouse monoclonal anti-Flag (1:1,000) and anti-clathrin (1:1,000) antibodies, or stained with Coomassie blue for GST protein detection.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation experiments were performed as previously described⁶⁷. Briefly, HEK293SL cells transfected with 3 μ g V2R and 500 ng of Flag- β -arrestin2 were serum-starved for 30 min, and then pretreated for 20 min with DMSO or Barbadin (50 μ M) before stimulation with AVP (1 μ M) for 2.5 and 5.0 min. Stimulation was stopped by adding dithiobis succinimidyl propionate (DSP) to cells (2mM). Cells were then washed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and lysed in RIPA buffer (50 mM Tri-HCl, pH 7.4, 1% NP-40 (v/v), 0.5% Na-Deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecyl sulfate (w/v), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF). Total cell lysates (TLC) were immunoprecipitated with anti-AP1/2 antibody (25mg) and then analyzed by western blot using anti-adaptin (BD Biosciences, 1:1000) for TCL and AP1/2 (1:1,000) for IP samples, anti-epsin (1:500) or anti-Flag antibodies (1:1,000), and secondary HRP antibodies (1:7,000)⁶¹. AP1/2 antibody has been reported to detect both the β 1 and β 2 subunits, which have different sizes. However, in HEK293SL, AP1/2 antibody mainly immunoprecipitated and recognized a protein of ~105 kDa (Supplementary Fig. 9), which we validated to be immune-reactive for β 2-adaptin using a specific antibody against this subunit (BD Bioscience). This was confirmed using β 2-adaptin knock out cells (CRISPR- β 2Ad-LY5, Supplementary Fig. 7).

cAMP assay

Intracellular cAMP accumulation was measured using the cAMP dynamic-2 kit, a competitive immunoassay based on homogeneous time-resolved fluorescence technology. HEK293T cells, as well as HEK293T stably expressing either V2R or β 2AR were starved for 4 hours in DMEM before being processed. Cells were rinsed once in PBS and once in cAMP-assay buffer (PBS with 1% BSA and 0.5 mM IBMX), detached and resuspended in the same buffer, then seeded (4×10^4 cells/well) in 96-well microplates. For concentration-response curves, cells were pretreated or not (DMSO) with Barbadin at the indicated concentrations for 30 min (1% DMSO final concentration in each well), then treated at room temperature with vehicle, AVP (100 nM), ISO (1 μ M) or forskolin (10 μ M) for 15 min, and put at -80°C for 1 hour. For kinetics experiments, cells were pretreated or not (DMSO) with Barbadin (50 μ M) for 30 min, then treated with vehicle, AVP (100 nM) or ISO (1 μ M) for the indicated times, and put at -80°C for 1 hour. Once thawed, cells (4×10^3 cells/well) were transferred in 384-well plates and incubated with cAMP labeled with the dye d2, and anti-cAMP antibody labeled with Cryptate according to the manufacturer's protocol. Reading of the homogeneous time-resolved fluorescence signal was performed on an Artemis plate reader.

ERK1/2 activation assay

HEK293T cells (10^5 cells/well) were seeded in a 6-well plate and transfected with a V2R encoding plasmid. Forty-eight hours post-transfection, cells were serum starved for 30 min in MEM containing 20 mM HEPES, treated with either DMSO or Barbadin (50 μ M) for 10 min, and then stimulated with vehicle (MEM), AVP (1 μ M) or epidermal growth factor (EGF, 100 ng/mL) for the indicated times. Treatment was stopped on ice with cold PBS, and cells were solubilized in 2x laemmli buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol

(v/v), 0.01 % bromophenol blue (w/v), and 5 % β -mercaptoethanol (v/v)). Lysates were resolved on a 10 % SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-phospho-ERK1/2 (1:1,000) and anti-total-ERK1/2 (1:2,000). Signals from western blots were determined by densitometry analysis using the Image J software (NIH).

Data and statistical analyses

Nonlinear regression analysis of the concentration-response and kinetics curves and statistical analyses (assuming similar variance between groups) were performed with GraphPad Prism software. For the concentration-response curves the “log inhibitor vs. response - three parameters (Hill slope = -1)” fitting was used. Student’s t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) and Tuckey’s post-hoc tests were performed as appropriate (see figure legends). Two-way ANOVA and Bonferroni’s post-hoc tests (comparison between all groups) were used for statistical analysis of western blot signals for ERK and co-immunoprecipitation assays, as well as for compounds’ effect on receptor endocytosis kinetics by FACS. Colocalization of signals from microscopy experiments was analyzed using Pearson’s correlation coefficient.

Data availability

The authors declare that all data supporting the findings in this study are presented within the article and its Supplementary Information files and available from the corresponding author upon request. Amino acid sequences for h β 2-adaptin are provided in **Supplementary Data 1**.

References

1. Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 609-622 (2009).
2. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 521-533 (2011).
3. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-1550 (1990).
4. Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**, 363-366 (1996).
5. Goodman OB, Jr., *et al.* Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450 (1996).
6. Laporte SA, *et al.* The beta2-adrenergic receptor/beta-arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3712-3717 (1999).
7. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. 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**, 17201-17210 (2000).
8. Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**, 221-228 (2010).
9. Irannejad R, von Zastrow M. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology* **27**, 109-116 (2014).
10. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-517 (2005).
11. Vilardaga JP, Jean-Alphonse FG, Gardella TJ. Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol* **10**, 700-706 (2014).
12. Tsvetanova NG, Irannejad R, von Zastrow M. G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J Biol Chem* **290**, 6689-6696 (2015).
13. Thomsen AR, *et al.* GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **166**, 907-919 (2016).

14. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517-533 (2011).
15. Hanyaloglu AC, von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 537-568 (2008).
16. Gurevich VV, Gurevich EV. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 105-111 (2004).
17. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta(2)-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23120-23126 (2000).
18. Scott MG, Benmerah A, Muntaner O, Marullo S. Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J Biol Chem* **277**, 3552-3559 (2002).
19. Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG. beta-arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization - Identification of a beta-arrestin binding site in beta(2)-adapitin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 9247-9254 (2002).
20. Schmid EM, *et al.* Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* **4**, e262 (2006).
21. van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* **122**, 553-563 (1993).
22. Krupnick JG, Santini F, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem* **272**, 32507-32512 (1997).
23. Mundell SJ, Loudon RP, Benovic JL. Characterization of G protein-coupled receptor regulation in antisense mRNA-expressing cells with reduced arrestin levels. *Biochemistry* **38**, 8723-8732 (1999).
24. Hamdan FF, *et al.* Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 29089-29100 (2007).
25. Edeling MA, *et al.* Molecular switches involving the AP-2 beta2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly. *Dev Cell* **10**, 329-342 (2006).

26. Namkung Y, *et al.* Monitoring G protein-coupled receptor and beta-arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun* **7**, 12178 (2016).
27. Rene P, *et al.* Pharmacological Chaperones Restore Function to MC4R Mutants Responsible for Severe Early-Onset Obesity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **335**, 520-532 (2010).
28. von Kleist L, *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* **146**, 471-484 (2011).
29. Dutta D, Williamson CD, Cole NB, Donaldson JG. Pitstop 2 Is a Potent Inhibitor of Clathrin-Independent Endocytosis. *Plos One* **7**, (2012).
30. McCluskey A, *et al.* Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic* **14**, 1272-1289 (2013).
31. Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **275**, 6439-6446 (2000).
32. Jing SQ, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge IS. Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific signal sequence for internalization. *The Journal of Cell Biology* **110**, 283-294 (1990).
33. Marion S, Fralish GB, Laporte S, Caron MG, Barak LS. N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the beta-arrestins. *J Biol Chem* **282**, 18937-18944 (2007).
34. Krupnick JG, Goodman OB, Jr., Keen JH, Benovic JL. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem* **272**, 15011-15016 (1997).
35. Kim YM, Benovic JL. Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem* **277**, 30760-30768 (2002).
36. Luttrell LM, *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 2449-2454 (2001).
37. Azzi M, *et al.* 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 (2003).

38. Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M. The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal* **19**, 32-41 (2007).
39. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev* **62**, 305-330 (2010).
40. Gales C, *et al.* Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786 (2006).
41. Wells JA, McClendon CL. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**, 1001-1009 (2007).
42. Mullard A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 172-174 (2012).
43. Shukla AK, *et al.* Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* **497**, 137-141 (2013).
44. Aguet F, Antonescu CN, Mettlen M, Schmid SL, Danuser G. Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Dev Cell* **26**, 279-291 (2013).
45. Krupnick JG, Goodman OB, Keen JH, Benovic JL. Arrestin/clathrin interaction - Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxyl terminus. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15011-15016 (1997).
46. Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J* **18**, 2489-2499 (1999).
47. Zimmerman B, *et al.* Role of ssarrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling. *Cell Signal* **23**, 648-659 (2011).
48. Eichel K, Jullie D, von Zastrow M. beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol* **18**, 303-310 (2016).
49. Lohse MJ, Hofmann KP. Spatial and Temporal Aspects of Signaling by G-Protein-Coupled Receptors. *Mol Pharmacol* **88**, 572-578 (2015).
50. Ferrandon S, *et al.* Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* **5**, 734-742 (2009).

51. Irannejad R, *et al.* Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* **495**, 534-538 (2013).
52. Feinstein TN, *et al.* Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem* **288**, 27849-27860 (2013).
53. Lyga S, *et al.* Persistent cAMP signaling by internalized LH receptors in ovarian follicles. *Endocrinology*, en.2015-1945 (2016).
54. Calebiro D, *et al.* Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**, e1000172 (2009).
55. Kotowski SJ, Hopf FW, Seif T, Bonci A, von Zastrow M. Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron* **71**, 278-290 (2011).
56. Merriam LA, Baran CN, Girard BM, Hardwick JC, May V, Parsons RL. Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *J Neurosci* **33**, 4614-4622 (2013).
57. Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, Birnbaumer M. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2222-2226 (1998).
58. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**, 839-850 (2006).
59. Hill TA, *et al.* Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles--synthesis and functional activity of a family of indoles. *J Med Chem* **52**, 3762-3773 (2009).
60. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist* **2**, 203-208 (2012).
61. Zimmerman B, Simaan M, Lee MH, Luttrell LM, Laporte SA. c-Src-mediated phosphorylation of AP-2 reveals a general mechanism for receptors internalizing through the clathrin pathway. *Cell Signal* **21**, 103-110 (2009).
62. Morris GM, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785-2791 (2009).
63. Terrillon S, *et al.* Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol* **17**, 677-691 (2003).
64. Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors - Evidence for G

protein-coupled receptor kinase specificity. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 17734-17743 (1997).

65. Zimmerman B, *et al.* Differential beta-arrestin-dependent conformational signaling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal* **5**, ra33 (2012).

66. Paradis JS, *et al.* Receptor sequestration in response to beta-arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5160-5168 (2015).

67. Khoury E, Nikolajev L, Simaan M, Namkung Y, Laporte SA. Differential regulation of endosomal GPCR/beta-arrestin complexes and trafficking by MAPK. *J Biol Chem* **289**, 23302-23317 (2014).

68. Fessart D, *et al.* Src-dependent phosphorylation of beta2-adaptin dissociates the beta-arrestin-AP-2 complex. *J Cell Sci* **120**, 1723-1732 (2007).

69. Goupil E, *et al.* A Novel Biased Allosteric Compound Inhibitor of Parturition Selectively Impedes the Prostaglandin F2 alpha-mediated Rho/ROCK Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 25624-25636 (2010).

70. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* **8**, 2281-2308 (2013).

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. Monique Lagacé, Hervé Enslen and Stefano Marullo for critical reading of the manuscript, and Dr. Christian Le Gouill for the set-up of the computer cluster used for this study and for useful discussions and advice. EMCCD camera (EM N2 1024, Növv Cameras) was kindly loaned by the Canadian Space Agency. We thank the Molecular Imaging Platform of the Research Institute of the McGill University Health Centre and staff for providing services. At the time of this study, A.B. held postdoctoral fellowships from Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM) and Fonds de la Recherche du Québec – Santé (FRQS), B.Z. a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Banting and Best doctoral research award, and E.K. a studentship from the McGill Division of Endocrinology and Metabolism. J.S.P. holds a studentship from the UdeM faculté des études supérieures et postdoctorales. L.Y. holds a postdoctoral internship from Mitacs. This work was supported by CIHR Operating Grants to M.B. (MOP-10501), to S.A.L. (MOP-74603) and to P.P.R. (MOP-123408). M.B. holds a Canada Research Chairs in Signal Transduction and Molecular Pharmacology. At the time of this study, S.A.L. held a Canada Research Chair in Molecular Endocrinology and a senior scholarship from FRQS. P.P.R. is a senior Research Scholar of the FRQS.

Author contributions

A.B. and M.B. designed the study. A.B. performed the virtual screen, β 2-adaptin protein purification and cAMP experiments. A.B. and J.S.P. performed BRET and flow-cytometry experiments. B.Z. contributed to the design and execution of biochemical and microscopy experiments. S.A. performed microscopy and pulldown experiments. E.K. performed MAPK assays. J.G. performed BRET and MAPK assays. L.N. performed microscopy experiments. L.Y. performed pulldown experiments and generated the β 2Adaptin CRISPR cell line. Y.N. performed the internalization assay in VSMCs. H.K. performed the BRET imaging experiments. M.A. contributed in the experimental design of BRET and flow-cytometry assays, and generated the HA- β 2AR-Venus cell line. F.H. and D.V. performed and interpreted the TSA experiments. S.A.L. designed, supervised and interpreted experiments performed in his lab. All the authors analyzed the final data. A.B., J.S.P. and M.B. wrote the manuscript, with the assistance of B.Z., P.P.R. and S.A.L.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Figures

Figure 1

Screen for inhibitors of the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin.

(a) Flowchart outlining the steps of the virtual screening and the selection of candidate molecules to be tested.

(b) Schematic representation and dynamic range of the BRET-based assay used to test the compounds selected from the virtual screen that monitors the β 2-adaptin/ β -arrestin1 interaction. HEK293T cells were transfected with β 2-adaptin-YFP, β -arrestin1-RlucII and myc-V2R. BRET was measured following V2R stimulation with 100 nM AVP for 45 min. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using a paired Student's test (***, $p < 0.001$)

(c) β 2-adaptin/ β -arrestin1 interaction was assessed as described in (b) with AVP-stimulation following pre-incubation with the indicated compounds (100 μ M) for 25 minutes. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc tests were used to assess the statistical significance of the compound-induced BRET modulation compared to DMSO (***, $p < 0.001$).

Figure 2

Identification of Barbadin (compound #42) as an inhibitor of the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin.

(a,b,c) Concentration-response curves of compounds #1, #33 and #42 selected from the BRET-based screen (Fig. 1) using the same β 2-adaptin/ β -arrestin1 interaction assay. Dotted line represents the level of AVP-promoted BRET upon pre-incubation with DMSO. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(d) Chemical structure of Barbadin (IUPAC name: *3-amino-5-(4-benzylphenyl)-3H,4H-thieno[2,3-d]pyrimidin-4-one*).

(e,f) Docking pose of Barbadin (*green sticks*) within the groove of β 2-adaptin platform subdomain (*grey ribbon (e)*, or *surface (f)*) that is the site of interaction with β -arrestin (*orange ribbon and sticks (f)*). β 2-adaptin residues known to interact with β -arrestin are labeled and shown as grey stick. Hydrogen-bonds interactions between Barbadin and both Tyr-888 and Glu-

902 are depicted as magenta dotted lines (e). Superimposition of Barbadin with the β -arrestin1 C-terminus peptide as in the co-crystal structure (PDB entry 2IV8), where Phe-388, Phe-391 and Arg-395 are the three key residues for β -arrestin binding interaction (shown from top to bottom as *orange sticks*) (f).

(g) Thermal denaturation of β 2-adaptin (residues 700-937) and concentration-dependent stabilization effect of Barbadin. The maximum of the first derivatives of fluorescence (dF/dT) data from differential scanning fluorimetry corresponds to the melting temperatures (T_m , indicated with a dotted line) of β 2-adaptin in the presence of DMSO, Barbadin or β -arrestin1 C-tail peptide (positive control) at the indicated concentrations.

Figure 3

Barbadin specifically blocks the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin.

(a,b,c) BRET-based assay monitoring the interaction between β 2-adaptin-YFP and either β -arrestin1-RlucII or β -arrestin2-RlucII. HEK 293T cells were pre-incubated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30 min prior to 45 min receptor stimulation with AVP (100 nM, a), ISO (10 μ M, b) or AngII (100 nM, c). Data are the mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments and unpaired t-test were used to assess statistical significance (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.005$).

(d,e) BRET-based kinetics monitoring the interaction between β -arrestin1-RlucII and β 2-adaptin-YFP (d) or V2R-YFP (e) in HEK 293T cells pretreated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30 min prior to receptor stimulation with AVP (100 nM) for the indicated times. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(f) Effect of Barbadin on the co-immunoprecipitation between β -arrestins and AP2. HEK 293SL cells expressing V2R and Flag- β -arrestin2 were pretreated for 20 min with DMSO or Barbadin (50 μ M) before stimulation by AVP (1 μ M) for 2.5 or 5 min. Endogenous AP2 complexes (using the AP1/2 antibody) were immunoprecipitated (IP) from total cell lysates (TCL), and then analyzed by western blot using anti-Flag, anti-epsin or anti-adaptin antibodies as described in the Material and Methods. TCLs represent 5% of input used for IP. IP were quantified over 3 independent experiments and statistical significance was assessed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests (*, $p < 0.05$).

(g) Effects of Barbadin on the pull-down of β -arrestin1 and clathrin with GST- β 2-adaptin. DMSO or Barbadin (100 μ M) were incubated with GST- β 2-adaptin (592-937) beads. HEK 293T cells transfected with Flag- β -arrestin1 were lysed and added to the beads. The amounts of GST- β 2-adaptin were detected by Coomassie whereas β -arrestin1 and clathrin associated with GST- β 2-adaptin were detected by western blot using anti-Flag and anti-clathrin (heavy chain) antibodies, respectively. Relative intensities were normalized to the GST input for each condition and densitometry data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments and analyzed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests (NS, non-significant; ***, $p < 0.001$).

Figure 4

Barbadin inhibits GPCRs endocytosis.

(a,e) Schematic representation of the ebBRET-based assay used to follow agonist-induced receptor loss from the cell surface by monitoring the interaction between receptor-RLucII and rGFP-CAAX **(a)** or its translocation into endosomes using rGFP-FYVE **(e)**.

(b-d, f-h) V2R, β 2AR or AT1R interaction with either rGFP-CAAX **(b, c and d, respectively)** or rGFP-FYVE **(f, g and h, respectively)** was assessed by BRET following HEK 293T cells pre-incubation with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30 minutes before AVP (100 nM), ISO (10 μ M) or AngII (1 μ M) stimulation for the indicated times. Data are the mean \pm S.E.M. of a least 3 independent experiments.

(i) V2R localization was imaged by BRET. HEK 293T cells were transfected with V2R-RLucII and rGFP-CAAX, pretreated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30min and then stimulated with 100 nM AVP for 30 min. To generate BRET images, the ratio of acceptor photon counts to donor photon counts was calculated for each pixel and expressed as a color-coded heat map (lowest being black and purple, and highest red and white). Scale bar, 10 μ m.

Figure 5

Barbadin inhibits the β -arrestin- and AP2-dependent endocytosis of GPCRs.

(a-c) Cell surface expression of HA-V2R-Venus **(a,c)** or HA- β 2AR-Venus **(b)** transfected in HEK 293T cells was monitored by FACS following pre-incubation with DMSO, Barbadin (100

μM), Pitstop2 (100 μM) or Dyngo-4a (30 μM) for 30 min, prior to agonist stimulation (AVP (100 nM, **a** and **c**), ISO (10 μM , **b**)) at the indicated times. Data are the mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments. Statistical significance of the effect of Barbadin, Pitstop 2 and Dyngo, as compared to DMSO, was assessed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

(d) Cell surface expression of HA-ET_AR was monitored by FACS following pre-incubation with DMSO, Barbadin (100 μM) or Pitstop2 (100 μM) for 30 min, prior to ET1 (10 nM) stimulation for 30 min. Data are the mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments. Statistical significance was assessed by a one-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc tests (NS, non-significant; ** $p < 0.01$).

(e,f) Native transferrin receptor (TfR) uptake was monitored by FACS in HeLa cells. Cells were pretreated with DMSO, Barbadin (100 μM), or Pitstop2 (100 μM) for 30 min, then incubated with Alexa Fluor 633-conjugated transferrin antibody (100 $\mu\text{g/ml}$) for 30min at 4°C, and finally shifted to 37 °C for 15 min (**e**) or the indicated time (**f**). Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. Statistical significance was assessed by a one-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc tests (NS, non-significant; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Figure 6

Barbadin induces the retention of receptor/ β -arrestin complexes at the membrane, in clathrin-coated pits (CCPs).

(a,b) Confocal images and colocalization of β -arrestin2, β 2-Adaptin, and clathrin light chain- (CLC) in CCPs from AVP stimulated cells expressing V2R. Beta2-adaptin depleted HEK293 cells (CRISPR- β 2Ad-LY5) were transfected with β -arrestin2-mCherry, β 2-Adaptin-CFP and CLC-YFP, and HA-V2R, and serum-starved for 30 min in the absence or presence of Barbadin (10 μM), before being either left non-stimulated (Vehicle) or stimulated with AVP (1 μM) for 2.5 min. Cells were then fixed as described in the Methods section before visualization. Shown in the top panels are black and white micrographs of acquired fluorescent signals from the three-tagged proteins in each channel (red, cyan and yellow), and in color, are the overlay images. Lower color insets are close-up images from boxed areas. **(b)** Color images represent individual and overlay fluorescent signals taken from different areas, from cells transfected, treated and

stimulated as in **a**. Scale bars in images of whole cells, 10 μm ; and insets, 2 μm . Colocalization quantification is presented in Supplementary Fig. 7b-c.

(c) Colocalization and quantification of β -arrestin2-mCherry and β 2-adaptin-YFP in live HEK 293T cells stably expressing V2R. Cells were pretreated with DMSO or Barbadin (10 μM) for 30 min before stimulation with AVP (1 μM) for the indicated durations. Colocalization was quantified using the Pearson correlation coefficient over 3 independent experiments using 33 or 24 cells for DMSO and Barbadin condition, respectively. Statistical significance of the effect of Barbadin as compared to DMSO was assessed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests (*, $p < 0.05$).

Figure 7

Barbadin inhibits ERK1/2 activation and cAMP accumulation following agonist-stimulation of GPCR.

(a-c) Kinetics of ERK1/2 phosphorylation in HEK 293T cells expressing V2R (**a**) or EGFR (**b**) and pretreated with DMSO or Barbadin (50 μM) for 30 min before stimulation with AVP (100 nM, **a**) or EGF (100 ng/ml, **b**) at the indicated times. Western blots were quantified (**c**) and data shown are the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments and analyzed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-tests (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

(d,e) Kinetics of the agonist-promoted accumulation of cAMP in HEK 293T cells stably expressing V2R (**d**) or β 2AR (**e**) and pretreated with DMSO or Barbadin (50 μM) for 30 min before stimulation with AVP (100 nM, **d**) or ISO (10 μM , **e**) at the indicated times. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(f) ISO-promoted Gs activation measured by BRET in HEK293T cells transfected with HA- β 2AR, Gas-RLucII, G β 1, and G γ 2-GFP10, pretreated with DMSO or Barbadin (100 μM) for 30 min, before ISO (10 μM) stimulation for 5 min.

(g,h) Concentration-response curves of Barbadin effect on the intracellular cAMP production, in HEK293T cells stably expressing the V2R (**g**) or the β 2AR (**h**), upon agonist stimulation for 15 min with AVP (100 nM) or ISO (1 μM), respectively, following pre-treatment with DMSO (grey dotted line) or Barbadin (green) at the indicated concentrations for 30 min. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(i) Concentration-response curves of Barbadin effect on the intracellular cAMP production, in HEK293T cells stimulated with forskolin (10 μ M) for 15 min. Same DMSO and Barbadin pre-treatments as in (g,h). Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

Figure 8

Model for the biogenesis and internalization of clathrin-coated pits (CCPs), and Barbadin's effect on GPCRs endocytosis.

(a) Initiation of CCPs formation involves the association of AP2 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) at the plasma membrane (PM) and the recruitment of clathrin to AP2 at sites of nucleation. Growth and stabilization of coated-vesicles requires the recruitment of additional AP2 and clathrin, and endocytic accessory proteins like Epsin (not shown here) and β -arrestins. Agonist-activated GPCR/ β -arrestin complexes accumulate in CCPs through β -arrestin's interactions with AP2 (β 2 and μ subunits) and clathrin, stabilizing further the growing coated-vesicles. Stabilization of GPCR/ β -arrestin complexes and the recruitment of endocytic effectors like dynamin allows the matured coated-vesicles to commit for invagination and scission from the PM, which is followed by the uncoating (*i.e.* release of AP2 and clathrin) of internalizing vesicles.

(b) In the presence of Barbadin, initiation of CCPs still occurs because clathrin and AP2 are effectively recruited at sites of nucleation. Some receptor/ β -arrestin complexes will still coalesce into nucleating CCPs through β -arrestin's binding with clathrin and its low affinity interaction to AP2 (e.g. via the μ subunit). Because Barbadin prevents the interactions of β -arrestin with the appendage domain on the β 2-subunit of AP2, which prevents the stable formation of sufficient GPCR/ β -arrestin complexes in CCPs, the maturation of the coated-vesicles is hampered, and receptor internalization impeded.

Supplementary Figure 1

Compounds effect on luminescence and fluorescence signals.

The 52 compounds selected for the screen have been tested at 100 μ M in HEK293T cells overexpressing either the β -arrestin1-RLucII (top graph) or the β 2-adaptin-YFP (bottom graph) construct alone. One-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc tests were performed with DMSO as control to assess statistical significance of the differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***,

$p < 0.001$) (top graph). Compounds showing signal higher than one standard deviation from the average were identified (#) (bottom graph). Eleven of the 52 compounds were colored (underlined below the graphs). Of these, seven had a significant effect on the luminescence and 9 affected the fluorescence signal. They were discarded from further investigation.

Supplementary Figure 2

Barbadin is a reversible inhibitor of the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin1/2.

(a) Concentration-response curves of Barbadin on V2R-induced (AVP, 100 nM) β 2-adaptin/ β -arrestin2 interaction assay (green line). Dotted line represents the level of AVP-promoted BRET upon pre-incubation with DMSO. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(b) BRET-based assay monitoring the AVP-induced interaction between β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RlucII.

HEK 293T cells were pre-incubated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30 min prior to 45 min receptor stimulation

with AVP (100 nM). When indicated, cells were washed 3-times with PBS for 10 min at 37°C before agonist stimulation. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments and one-way ANOVA followed by Tuckey's post-hoc tests were used to assess statistical significance (NS, non-significant; ***, $p < 0.001$).

Supplementary Figure 3

Preliminary Structure-Activity-Relationship study of Barbadin.

(a,b) Concentration-response curves of Barbadin, Analogue-A, Analogue-B, Analogue-C and compound #43 on AVP-promoted (100nM) β 2-adaptin/ β -arrestin1 interaction. Colored substructures on Barbadin's analogues and #43 highlight the moieties where structural differences are found as compared to Barbadin's structure. Dotted line in the graphs represents the level of AVP-promoted BRET upon pre-incubation with DMSO. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(c) Docking poses of Barbadin (green), Analogue-C (pink) and compound #43 (grey) within the groove of β 2-adaptin platform subdomain shown as a semi-transparent surface and colored by lipophilic potential (orange: lipophilic; cyan: hydrophilic). Beta2-adaptin residues within a 4.5 Å radius from the compounds are depicted as sticks.

Supplementary Figure 4

Barbadin is a specific inhibitor of the interaction between β 2-adaptin and β -arrestin.

(a,b) BRET-based kinetics monitoring the interaction between β -arrestin2-RlucII and β 2-adaptin-YFP (a) or β 2AR-YFP (b). HEK 293T cells were pretreated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30 min prior to receptor stimulation with ISO (10 μ M) for the indicated times. Data are the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

(c) Cross-section confocal imaging of fixed HEK293 cells expressing β -arrestin2-mCherry and HA-V2R. Cells were serum-starved in DMEM for 30 min, and pre-treated with Barbadin (10 μ M) for another 30 min before being stimulated with AVP (1 μ M) for 2 min then fixed, as described in the Methods section. Detection of V2R at the plasma membrane was performed using an antibody against HA (12CA5) in combination with a secondary antibody coupled to AlexaFluor488 (goat anti-mouse) in non-permeabilized, PFA-fixed, cells. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary Figure 5

Barbadin inhibits GPCRs endocytosis: ebBRET and BRET imaging.

(a,e) Schematic representation of the ebBRET-based assay used to follow agonist-induced receptor loss from the cell surface by monitoring the interaction between receptor-RLucII and rGFP-CAAX (a) or its translocation into endosomes using rGFP-FYVE (e). PM: plasma membrane; EE: early endosome.

(b-d, f-h) V2R, β 2AR or AT1R interaction with either rGFP-CAAX (b, c and d, respectively) or rGFP-FYVE (f, g and h, respectively) was assessed by BRET following HEK 293T cells pre-incubation with DMSO or Barbadin at the indicated concentrations for 30 minutes before AVP (100 nM), ISO (10 μ M) or AngII (1 μ M) stimulation for 30 min. Dotted line represents the level of agonist-promoted BRET upon pre-incubation with DMSO. Data are the mean \pm S.E.M. of at least 3 independent experiments.

(i,j) AT1R localization imaged by BRET. HEK 293T cells were transfected with AT1R-RlucII and rGFP-CAAX (i) or rGFP-FYVE (j), pretreated with DMSO or Barbadin (100 μ M) for 30min and then stimulated with AngII (1 μ M) for 30 min. To generate BRET images, the ratio of acceptor photon counts to donor photon counts was calculated for each pixel and expressed as

a color-coded heat map (lowest being black and purple, and highest red and white). Scale bar, 10 μm .

Supplementary Figure 6

Effect of Barbadin on endogenous receptor internalization in rat VSMCs.

Rat VSMCs were incubated in the absence (DMSO) or presence of Barbadin (20 μM) for 30 min at 37 °C and then subjected to [¹²⁵I]-AngII binding/internalization on whole cells, as described in the Methods section. Data are expressed as percent internalization (acid-resistant binding over total binding) and represent the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. Statistical significance was assessed using a paired Student's t-test, comparing Barbadin-treated to vehicle (DMSO)-treated cells (**, $p < 0.01$).

Supplementary Figure 7

Characterization of the effects of Barbadin on the colocalization of receptor/ β -arrestin complexes with AP2 and clathrin in CCPs.

(a) Analysis of HEK293 cells depleted for β 2-adaptin (CRISPR- β 2Ad-LY5). Cells were transfected with either β 2-adaptin-CFP (β 2-Ad-CFP) or pcDNA3.1 (-), and lysed 48 hours post transfection for analysis. Lysates from HEK293 and CRISPR- β 2Ad-LY5 were immunoprecipitated with AP1/2 antibody, and samples analysed by Western blot using an anti-adaptin β antibody. Arrows indicate endogenous and transfected β 2-adaptin.

(b,c) Visualization (b) and quantification (c) of the colocalization of either β -arrestin (β arr2) and AP2 (β 2Ad) or β -arrestin and clathrin (CLC) in CRISPR- β 2Ad-LY5 cells. Beta-arrestin2-mCherry and β 2-adaptin-CFP, or β 2-adaptin-CFP and clathrin-YFP were transfected in HA-V2R cells. Cells were serum-starved for 30 min in the absence (DMSO) or presence of Barbadin (10 μM) and stimulated with AVP (1 μM) for 2.5 min before being fixed and visualized. Colocalization of fluorescent signals is shown in top panels. Scatterplots of fluorescent signals are shown in bottom panels, and colocalization coefficients were determined from the gated signals in the scatterplots using Zen Software (Zeiss) from at least 5 cell areas from 3 different experiments. Scale bar, 2 μm . Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni's multiple comparison test (***) $p < 0.001$).

(d) Colocalization of β -arrestin2 (β arr2-WT) and β -arrestin2 lacking its clathrin-binding site (β arr2- Δ Clath) with AP2 (β 2Ad). CRISPR- β 2Ad-LY5 cells were transfected with either β -arrestin2-YFP (β arr2-WT -YFP) or β -arr2- Δ Clath-YFP, with β 2-adaptin-mCherry and HA-V2R. Cells were serum-starved for 30 min, then incubated in the presence of 25 μ M Barbadin for another 30 min before being subjected to a 2.5 min stimulation with AVP (1 μ M). Cells were PBS-washed on ice and fixed before visualization. Scale bar, 2 μ m.

Supplementary Figure 8

Flow-cytometry assay monitoring HA-V2R-Venus expression at the cell surface (one biological replicate from Figure 5a)

Cells were pretreated with DMSO (a,b) or Barbadin (100 μ M) (c,d) for 30 min, followed by 15 min receptor stimulation with AVP (100 nM) (b,d), prior to FACS analysis. The cell population (black + red dots) shown on the dot plots excludes cellular debris, dead cells and doublets. Non-transfected cells were used to define the threshold of the YFP-positive subpopulation (red dots), representing the HA-V2R-Venus expressing cells. Within this subpopulation, the plasma-membrane receptor localisation was monitored using the N-terminally fused HA-tag detected with an anti-Alexa647-coupled secondary antibody against an anti-HA antibody, in the absence of permeabilization. Then, the Alexa-647 mean values were expressed as a percentage of the “pretreated DMSO; unstimulated” condition (set at 100%).

Supplementary Figure 9

Uncropped immunoblots

Supplementary Table 1

List of the 52 compounds selected for the BRET-based assay screen monitoring the interaction between β 2-adaptin-YFP and β -arrestin1-RLucII, and of subsequent Barbadin’s analogues. The acquisition numbers from the providers (Sigma and Enamine) are shown.

Figure 1

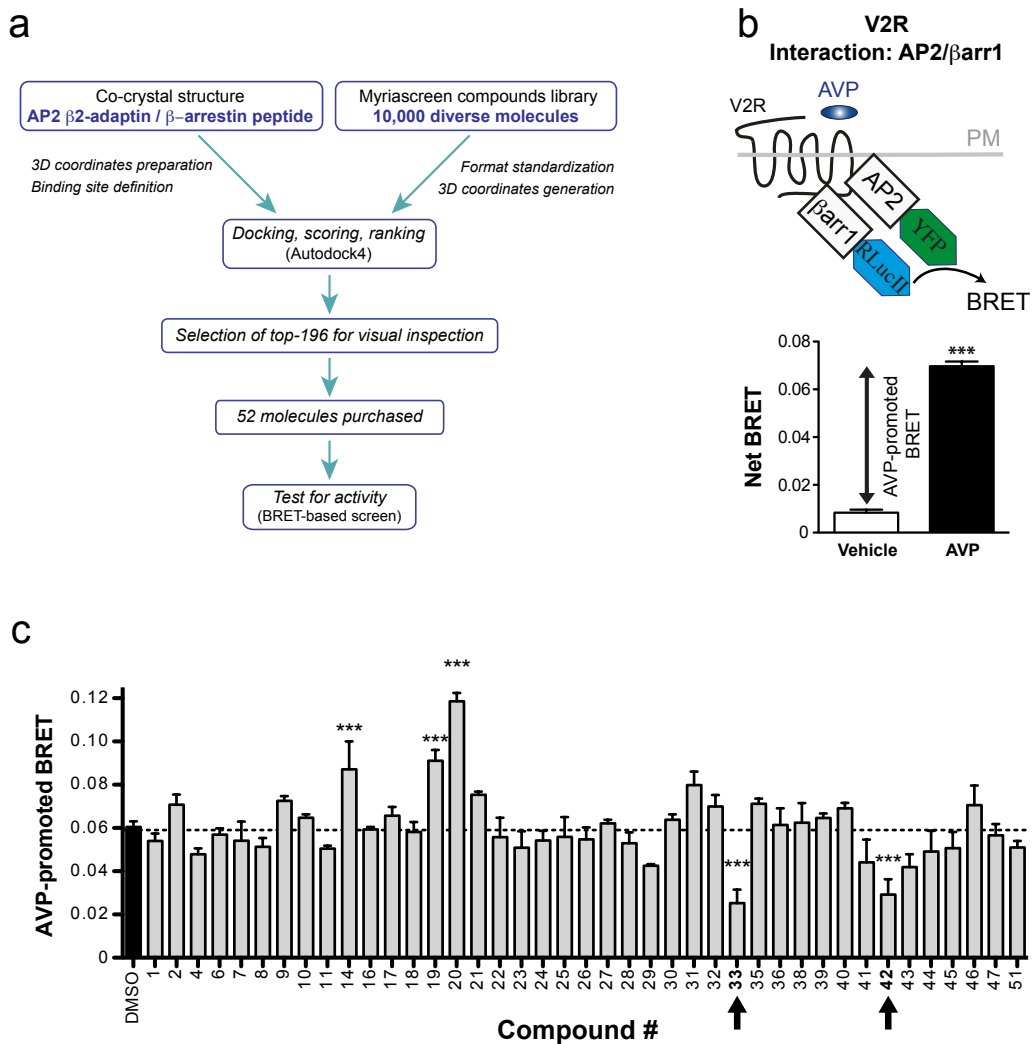


Figure 2

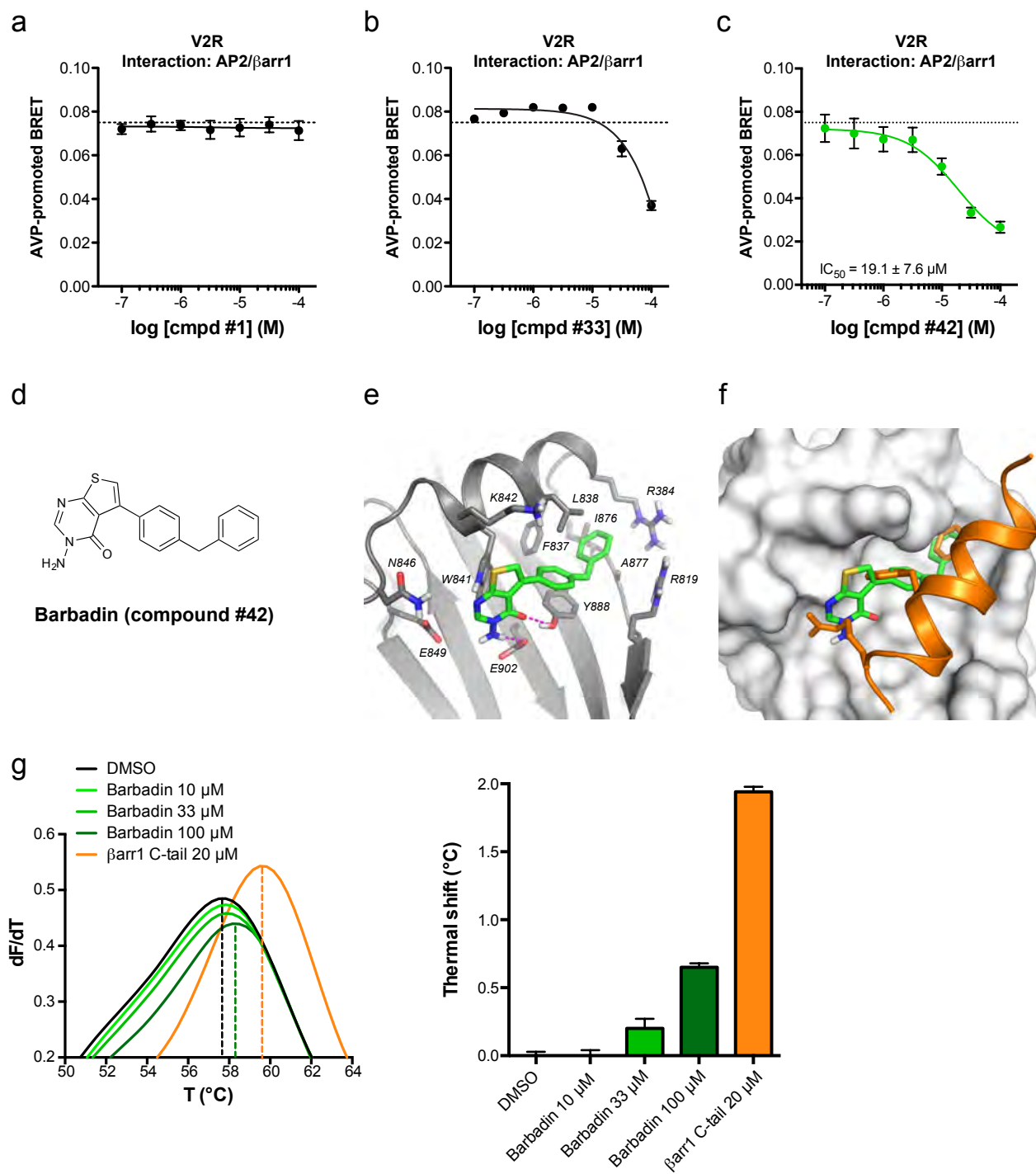


Figure 3

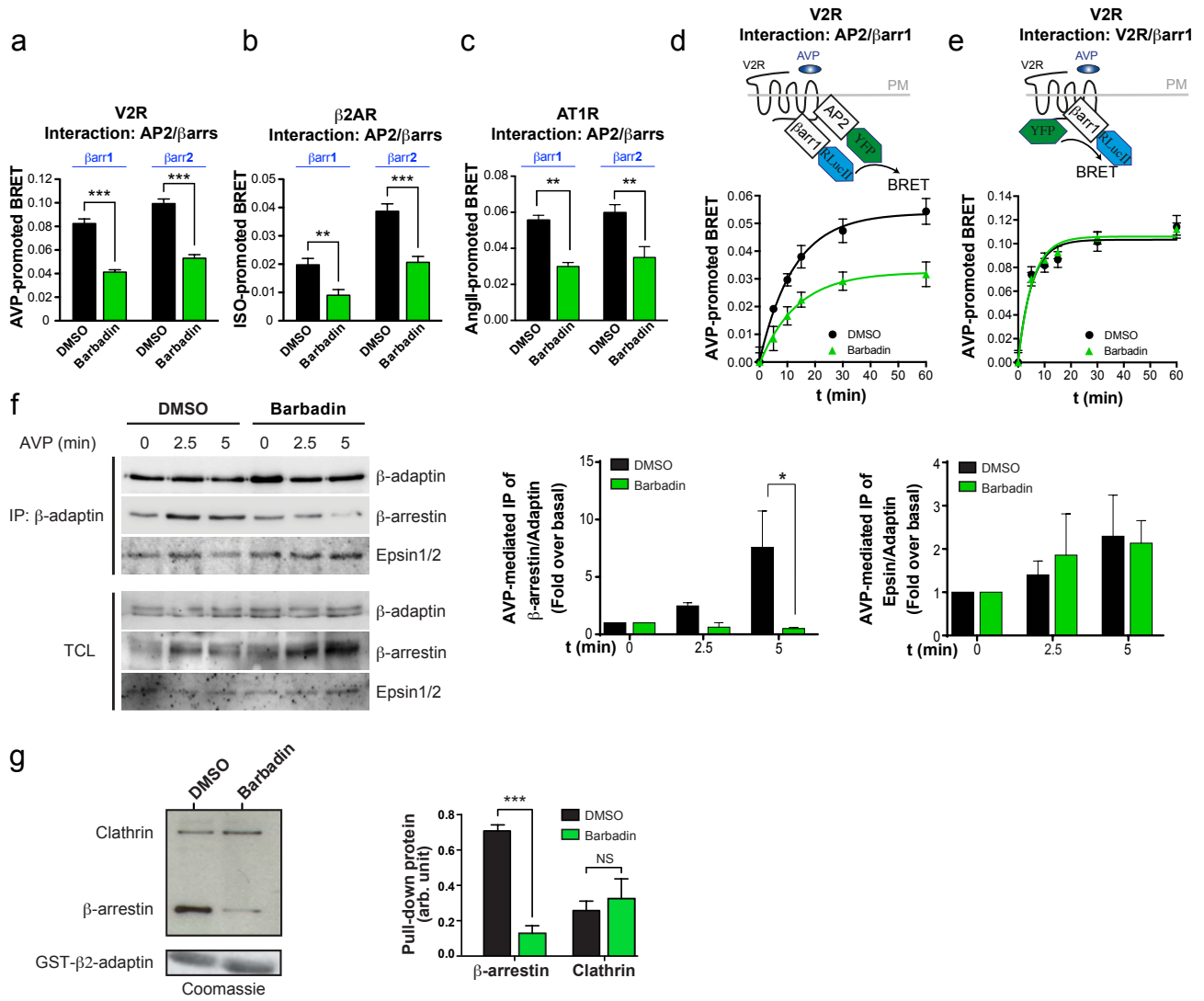


Figure 4

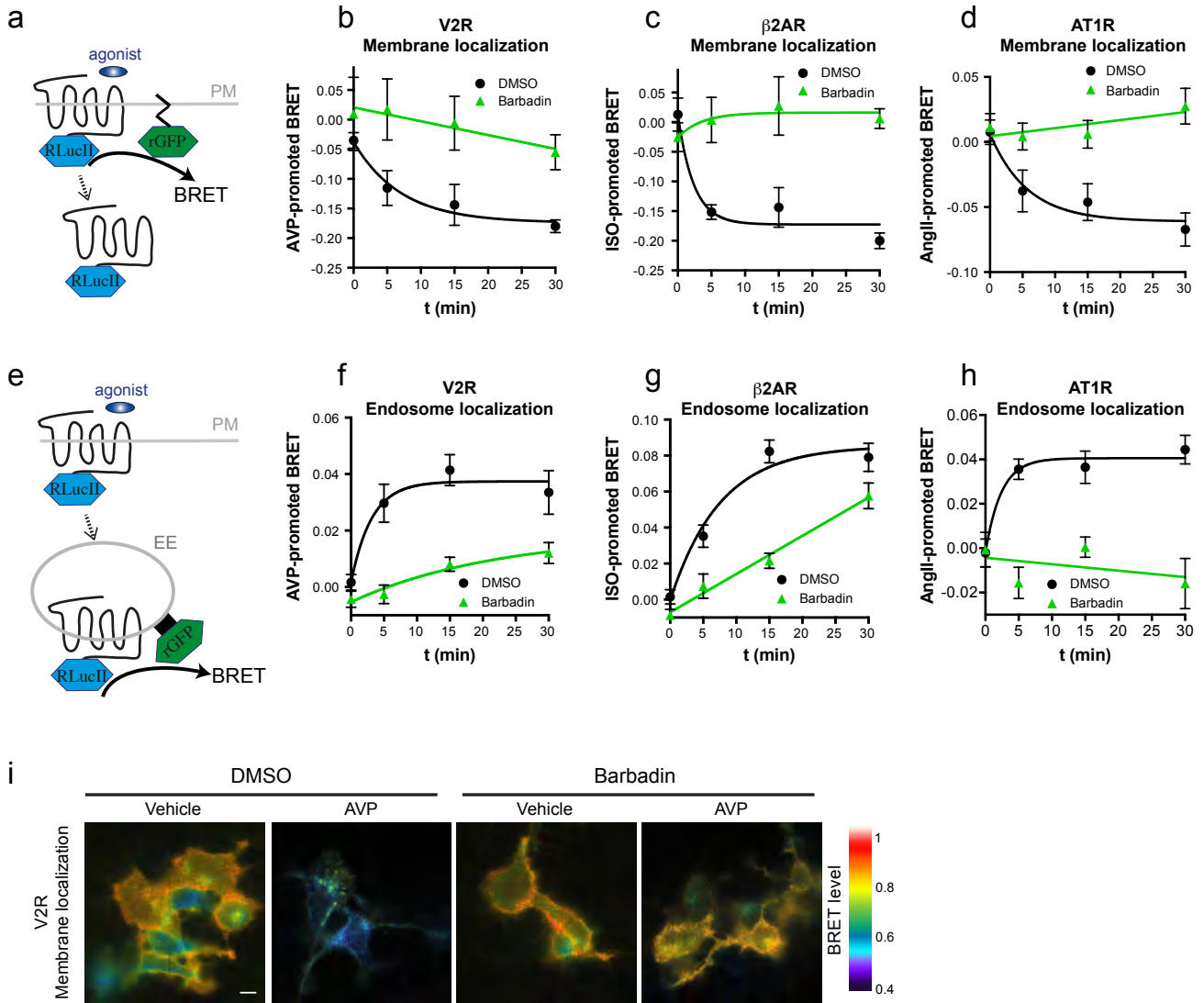


Figure 5

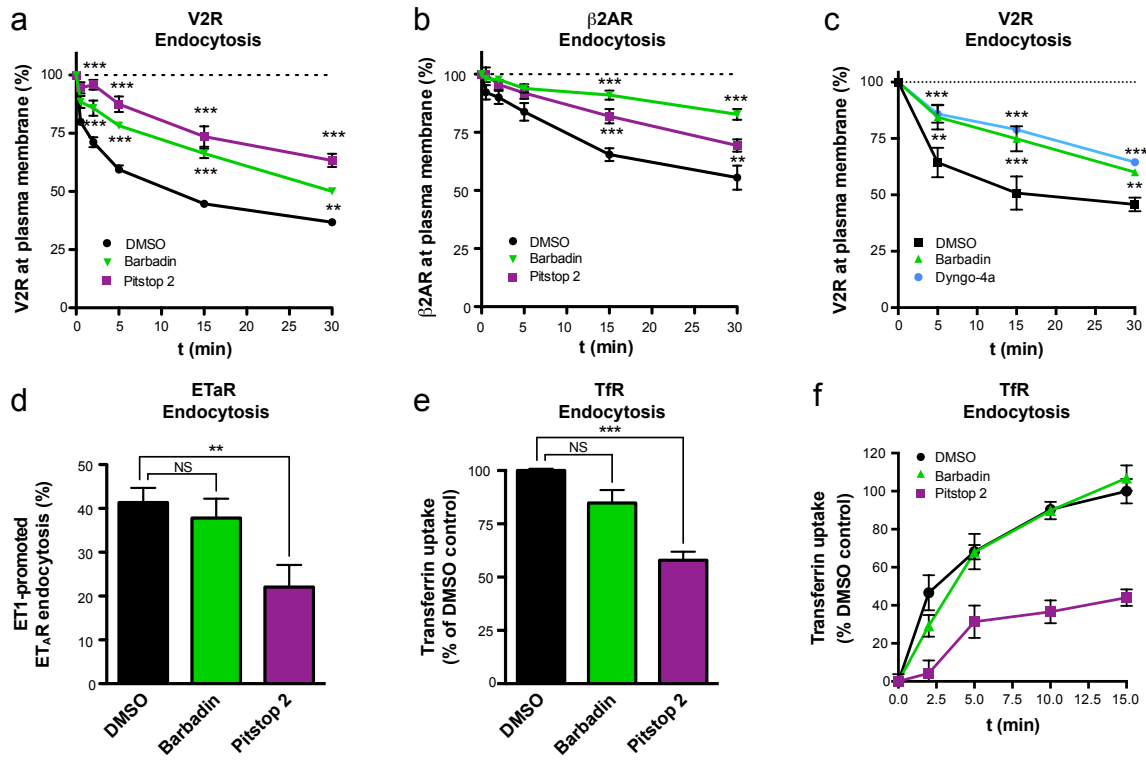


Figure 6

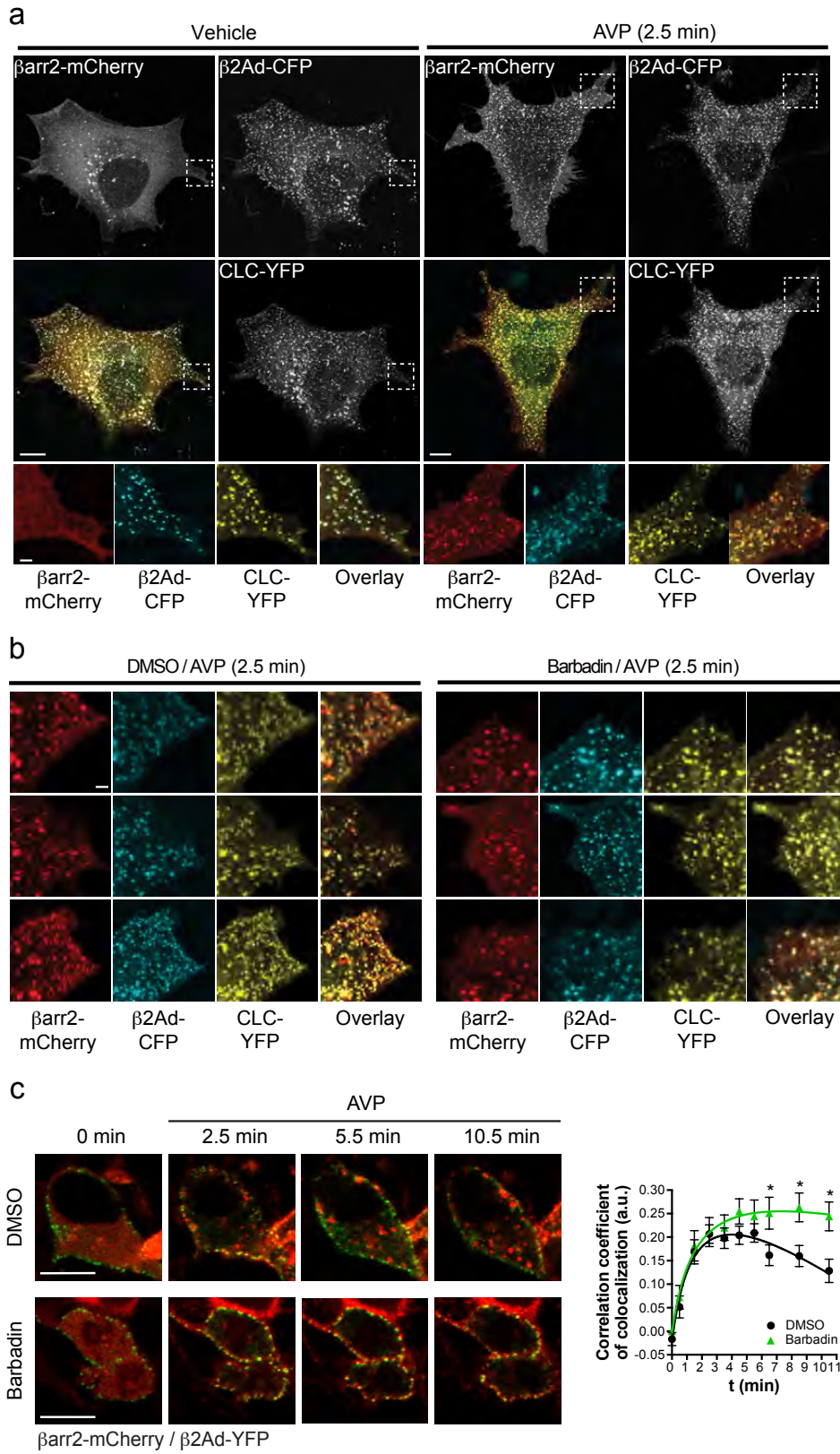


Figure 7

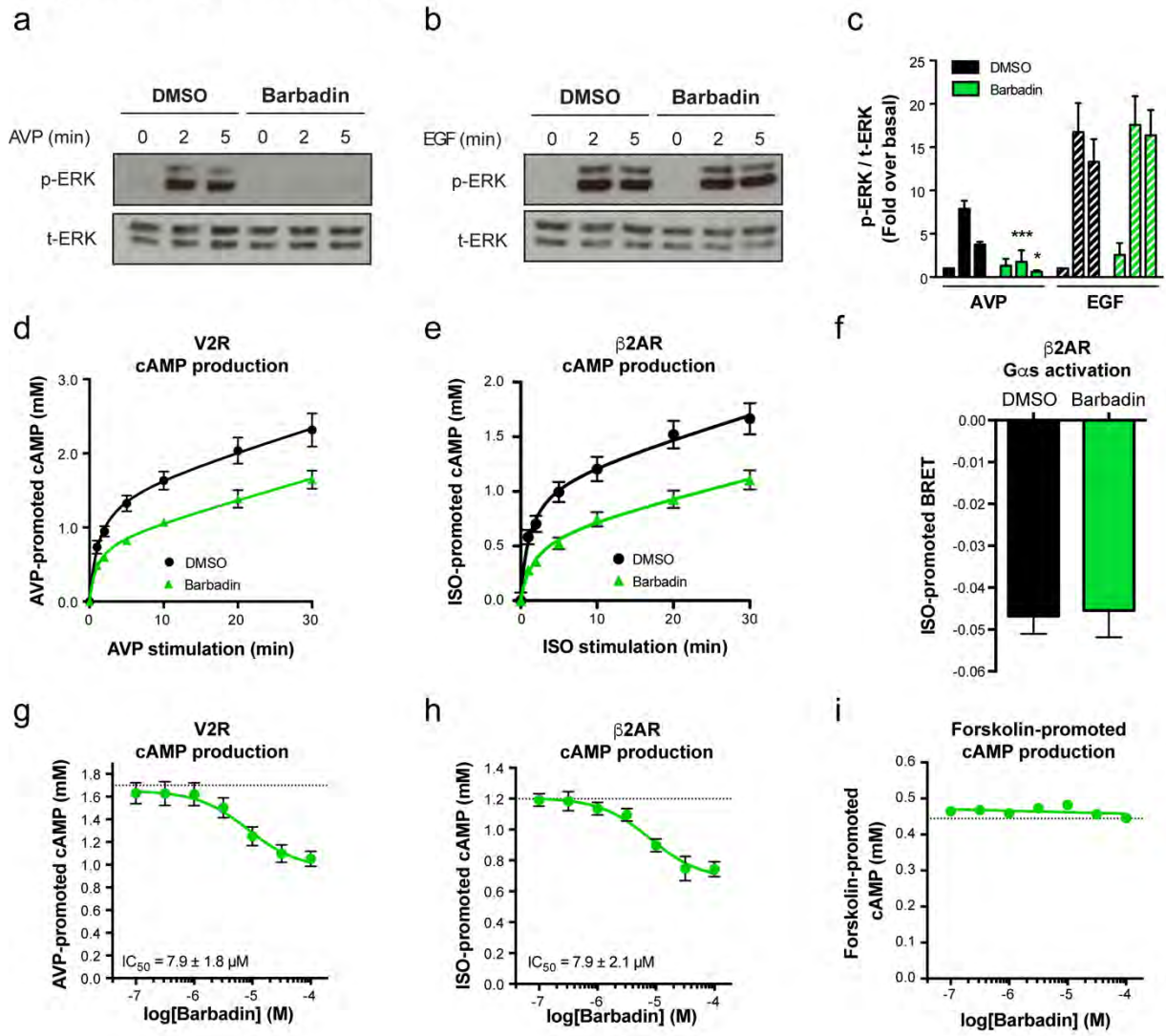
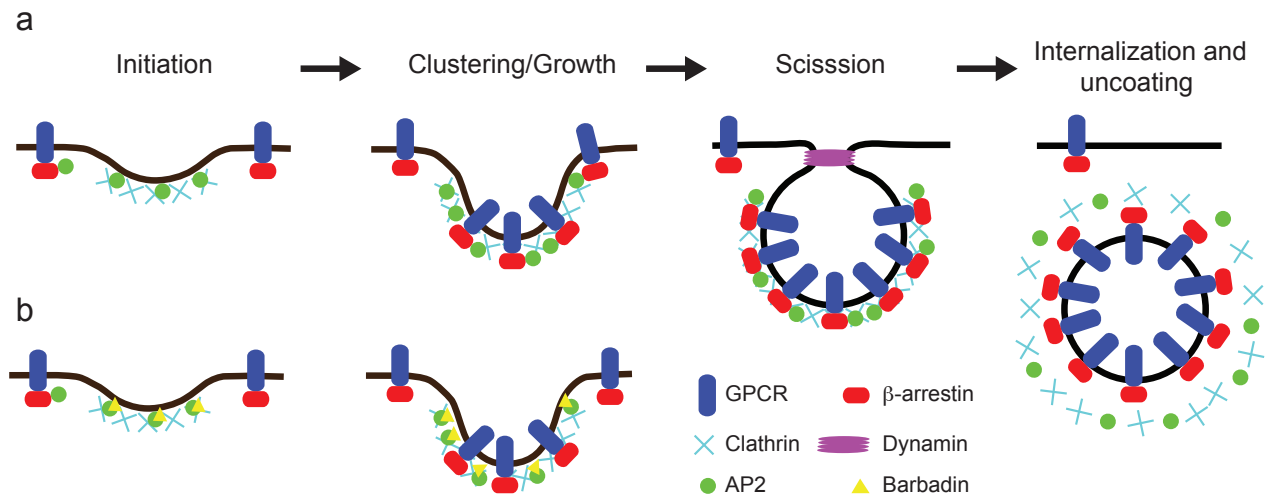
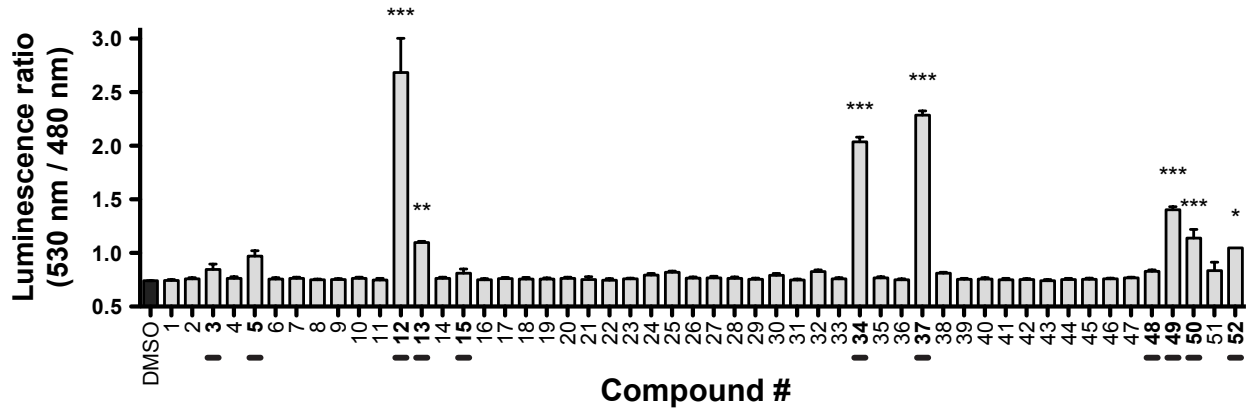


Figure 8

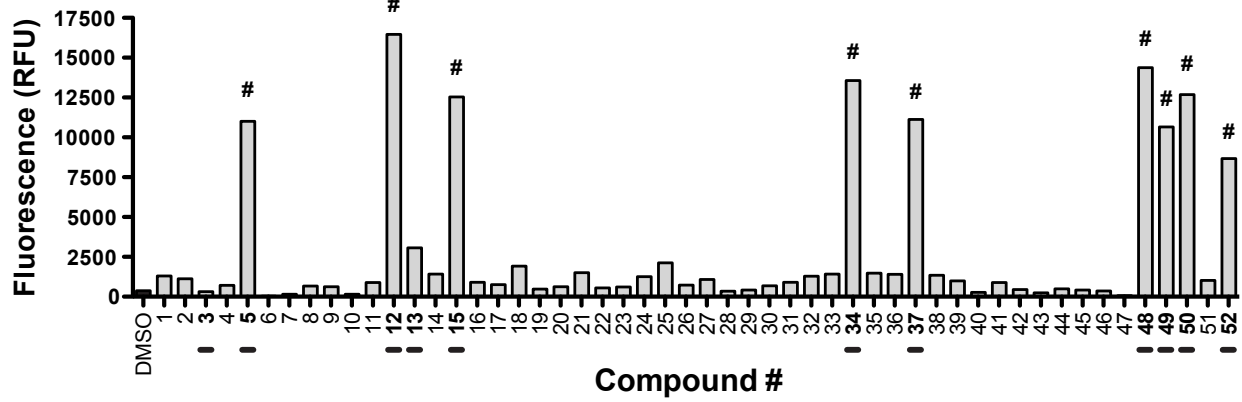


Supplementary Figure 1

HEK293T cells overexpressing β -arrestin1-RlucII only

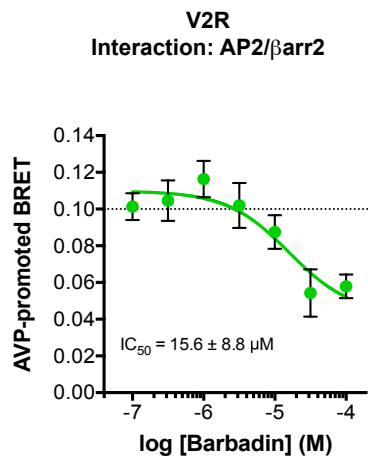


HEK293T cells overexpressing β 2-adaptin-YFP only

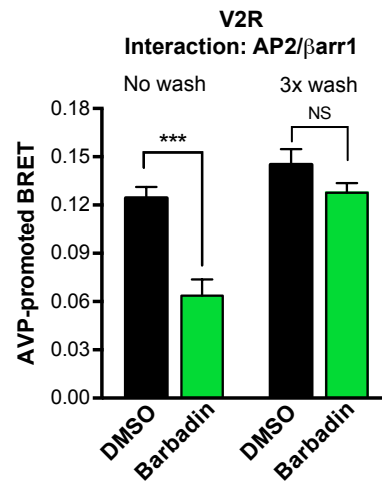


Supplementary Figure 2

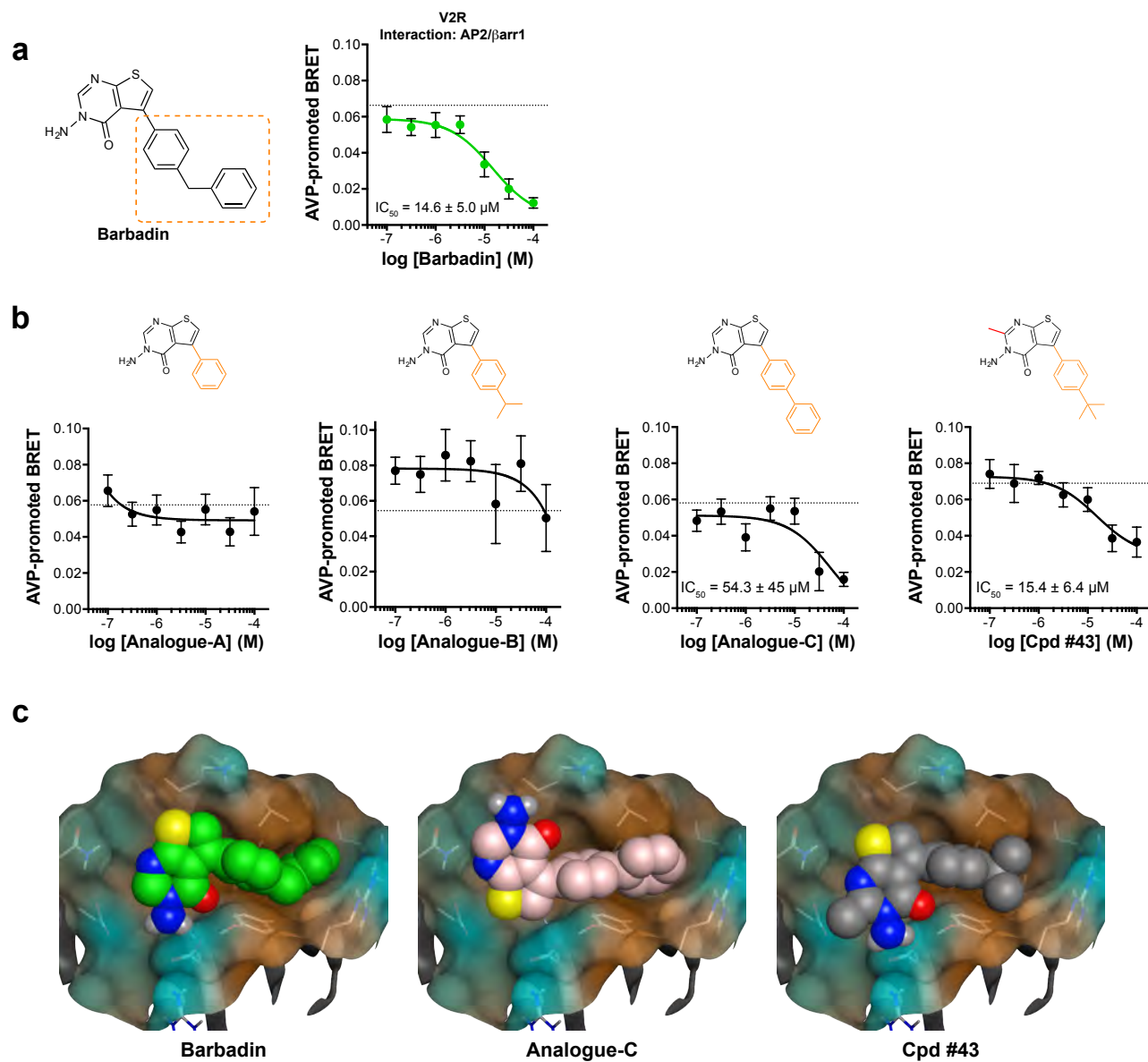
a



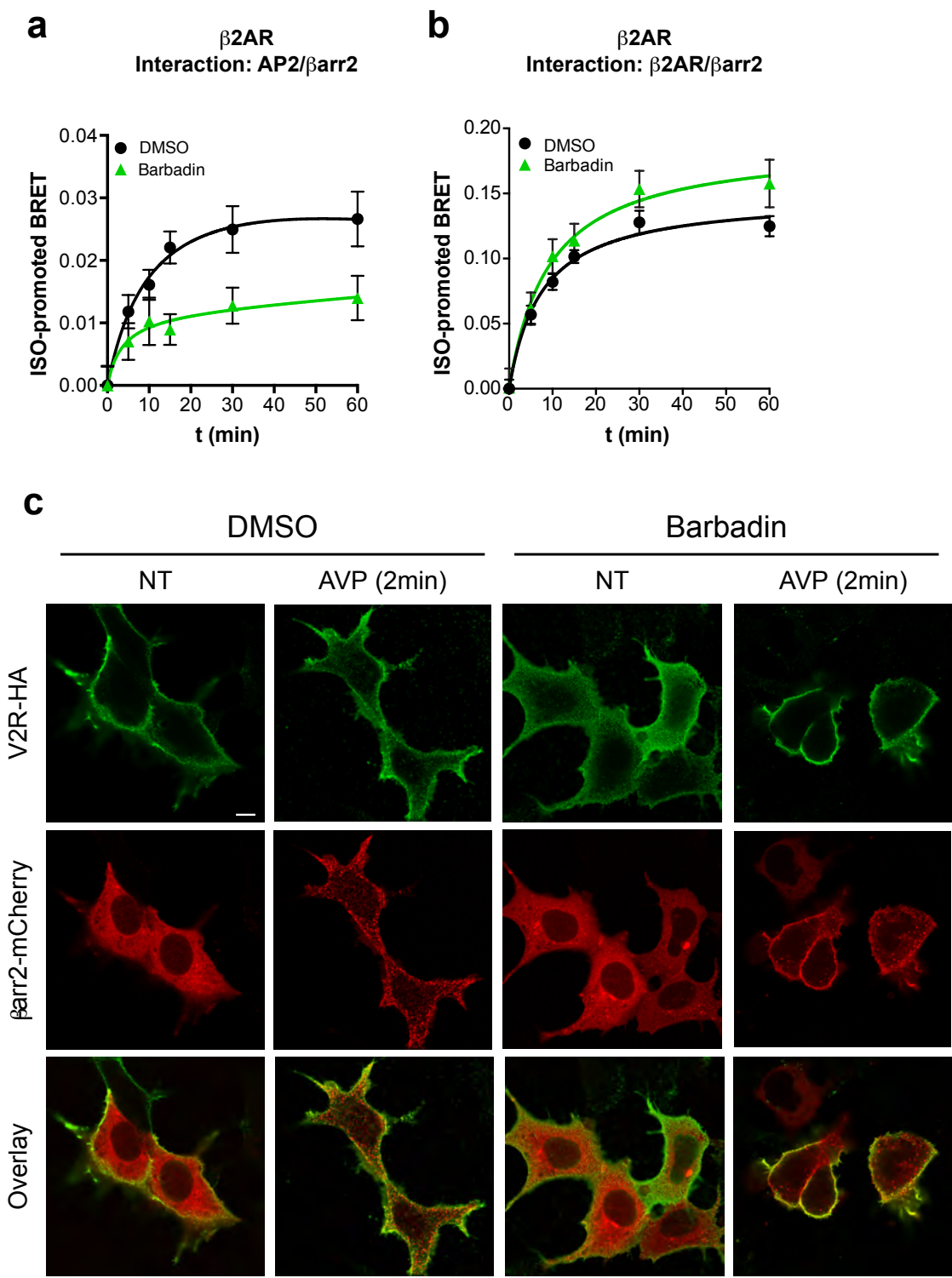
b



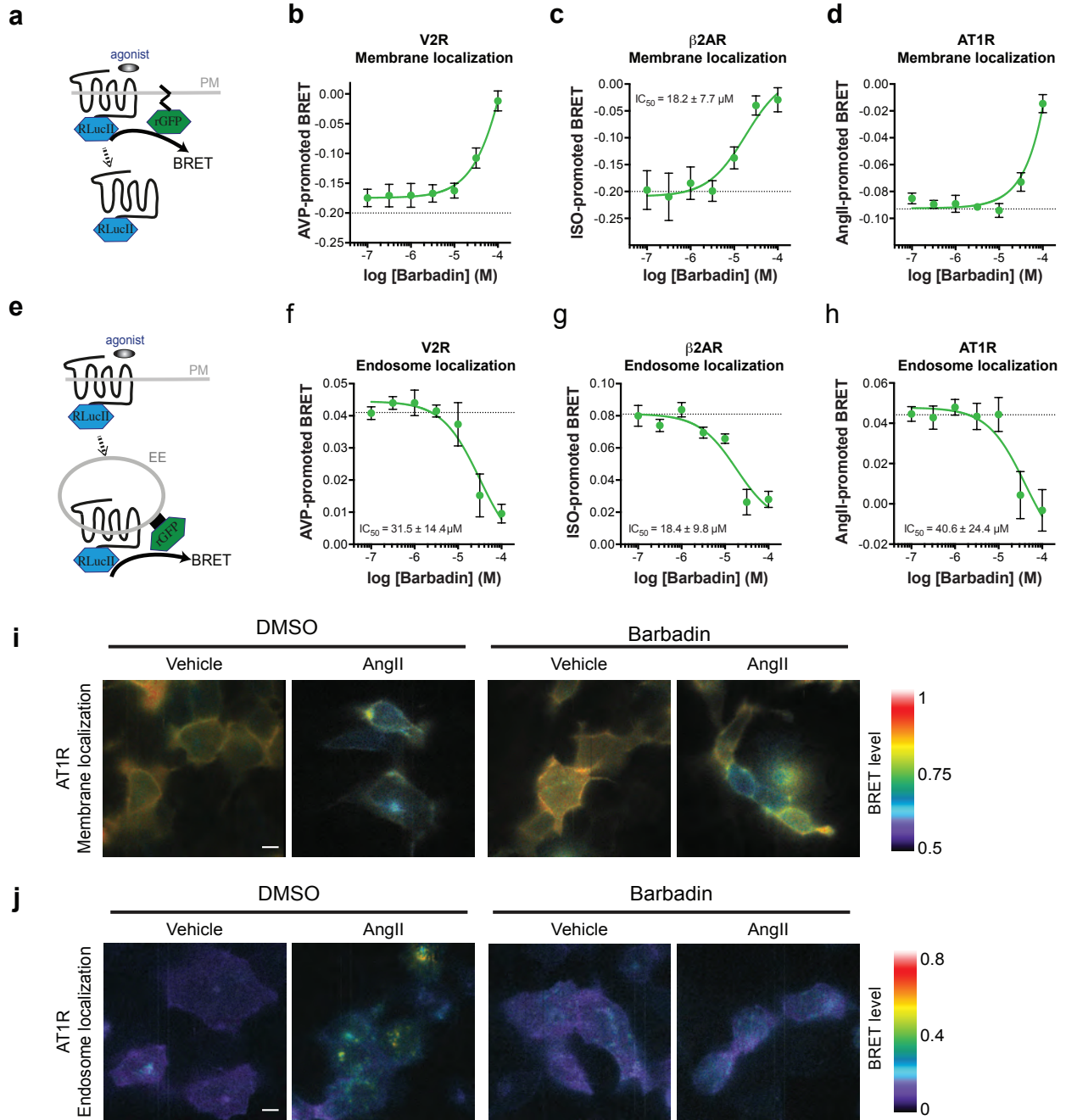
Supplementary Figure 3



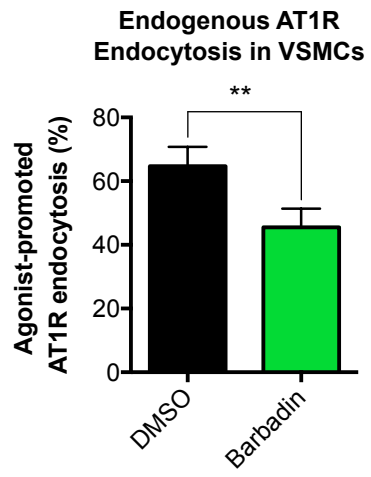
Supplementary Figure 4



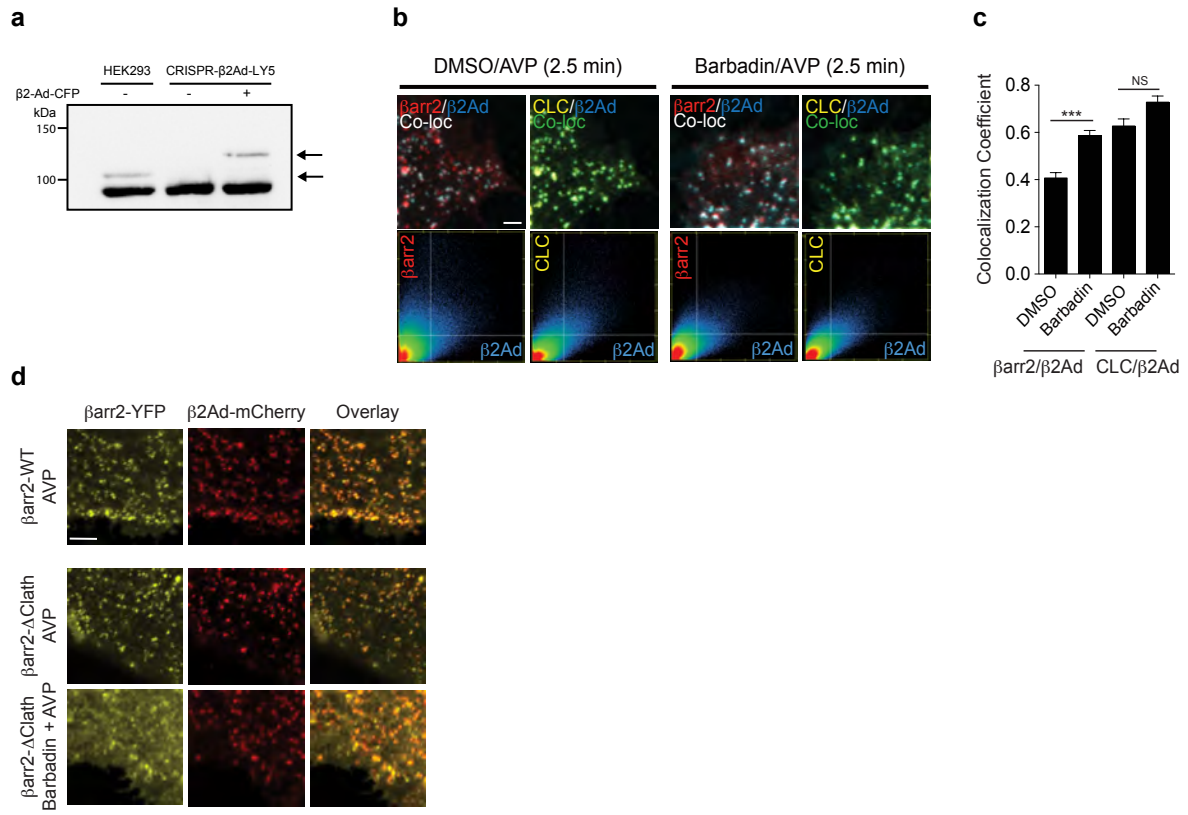
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

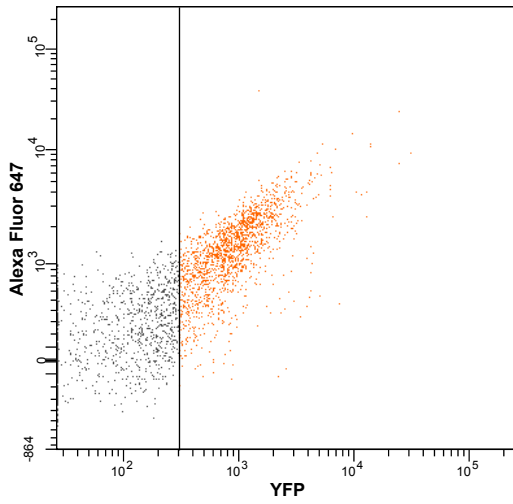


Supplementary Figure 7

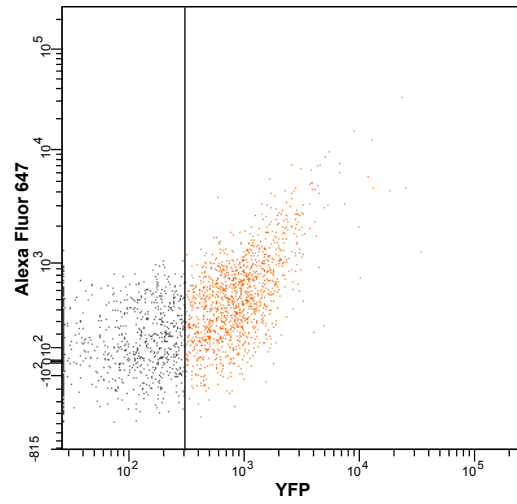


Supplementary Figure 8

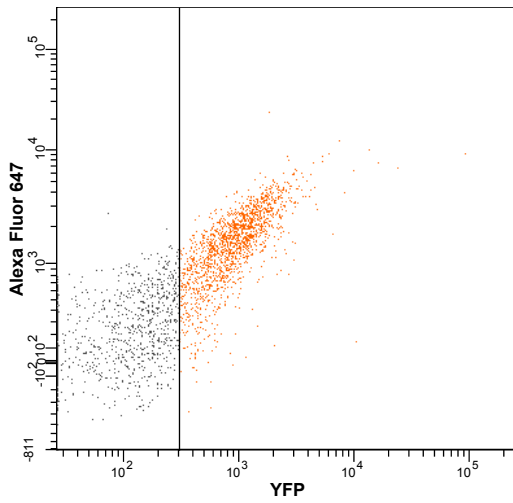
a pretreated DMSO; unstimulated



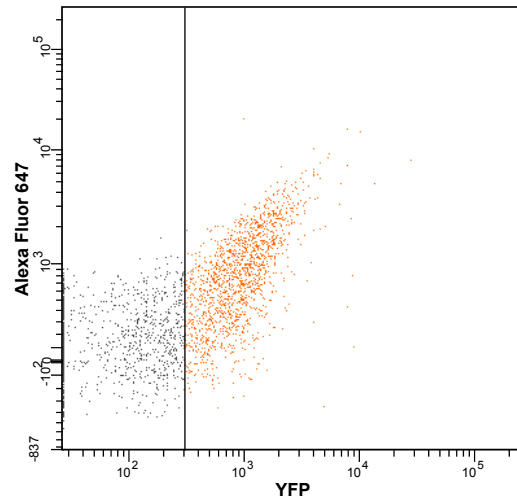
b pretreated DMSO; AVP 15 min



c pretreated Barbadin; unstimulated



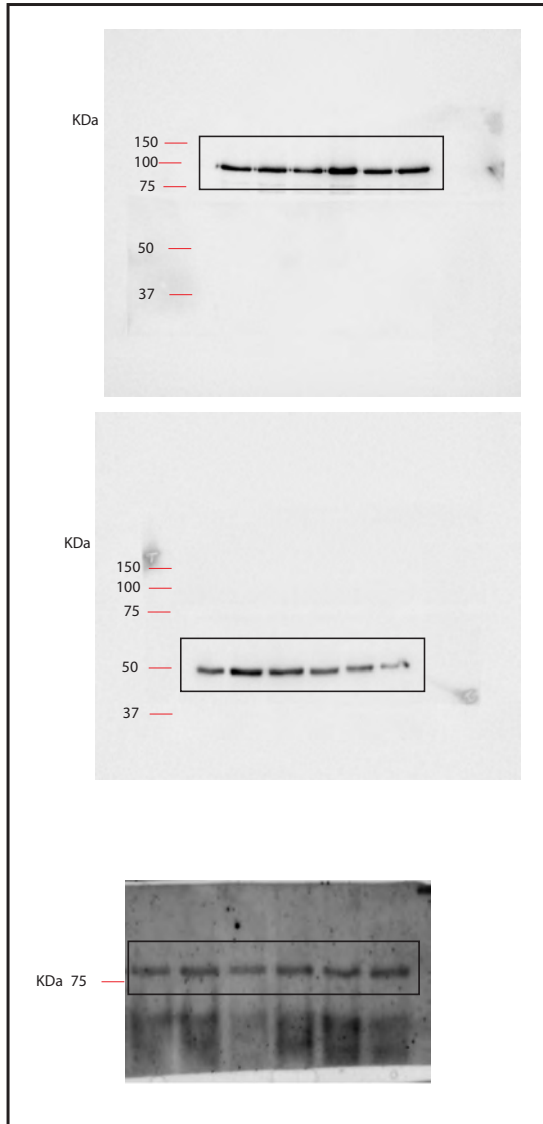
d pretreated Barbadin; AVP 15 min



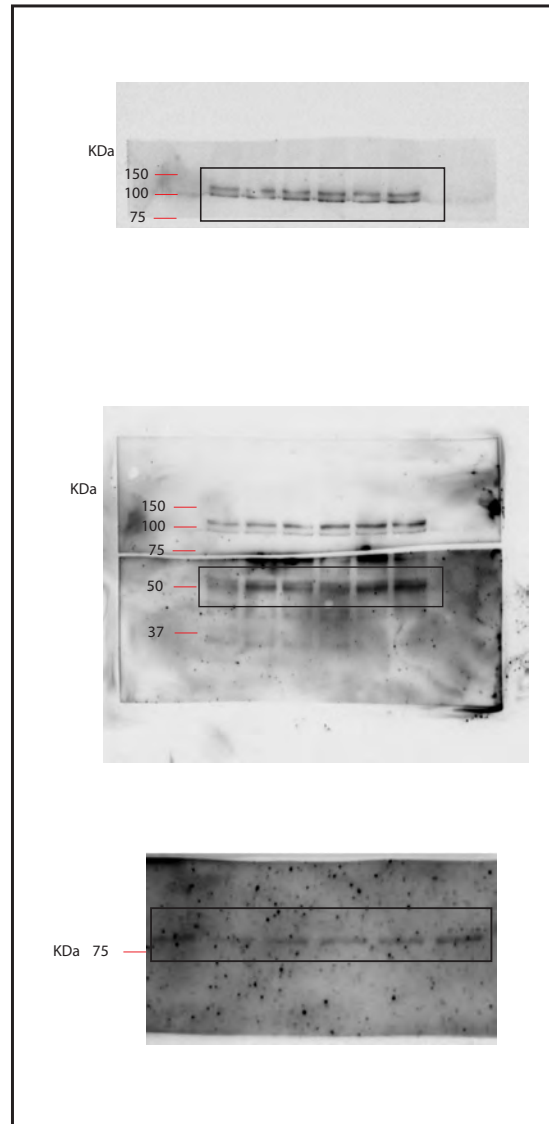
Supplementary Figure 9

Uncropped immunoblots for Figure 3f

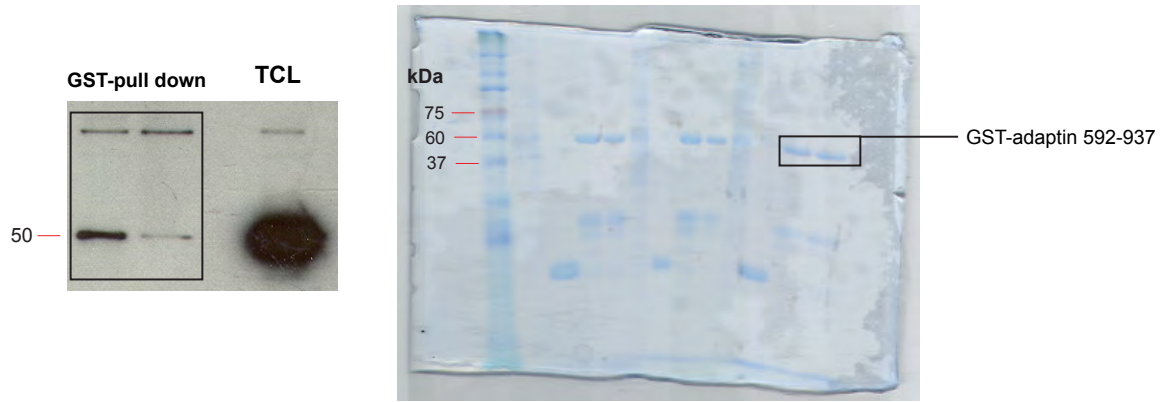
IP blot



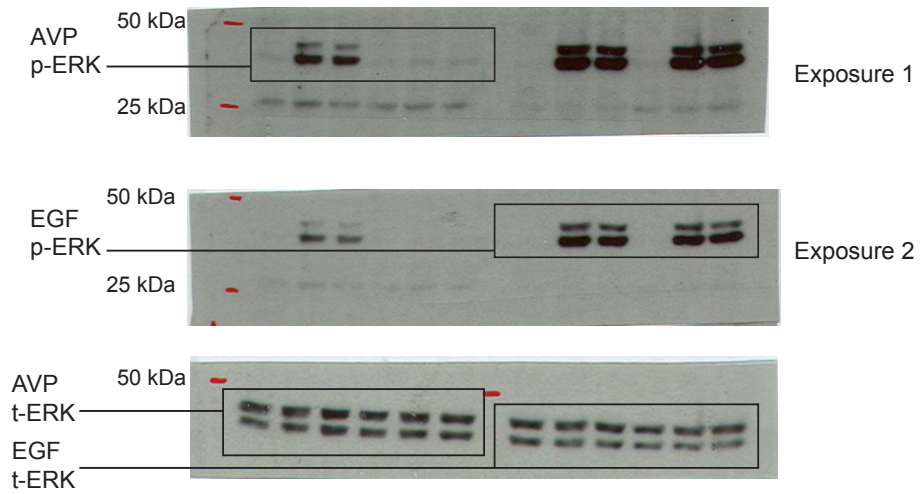
TCL blot



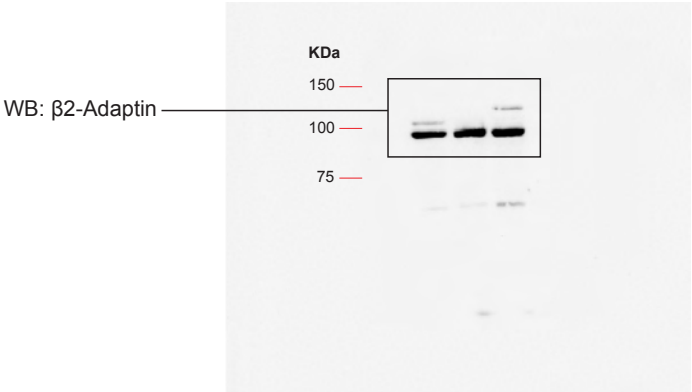
Uncropped immunoblot and Coomassie stained gel for Figure 3g



Uncropped immunoblots for Figure 7a and 7b



Uncropped immunoblots for Supplementary Figure 7a



Supplementary Table 1

Compound #	Sigma IDNUMBER
1	L128880
2	L132438
3	L148342
4	L157600
5	L162442
6	L187720
7	L225355
8	L253936
9	L320986
10	L330906
11	L432261
12	R101281
13	R127523
14	R155993
15	R172006
16	R412651
17	R432318
18	R432652
19	R432997
20	R433047
21	R433160
22	R458805
23	R459224
24	R460729
25	R461210
26	R463817

Compound #	Sigma IDNUMBER
27	R540889
28	R544175
29	R575887
30	R576735
31	R576794
32	R577332
33	R578843
34	R579785
35	R581070
36	R581666
37	R620831
38	R822671
39	R850179
40	R852341
41	R852430
42	R852597
43	R853216
44	R853755
45	R857394
46	R858005
47	R858730
48	R882852
49	R883719
50	R884324
51	R896942
52	R954993

Compound #	Enamine IDNUMBER
Analogue-A	Z56769636
Analogue-B	Z56821486
Analogue-C	Z57251039

Supplementary Data 1. Amino-acid sequences of human β 2-adaptin

human β 2 adaptin 592-937Stop (GST pull-down assay)

HLPIHHGSTDAGDSPVGTATNLEQPQVIPSQGDLLGDLLNLDLGPVNPQVSSMQMGAVDLLGGGL
DSLVGQSFIPSSVPATFAPSPTPAVVSSGLNDFELSTGIGMAPGGYVAPKAVWLPAVKAKGLEISGTFTH
RQGHYMEMNFTNKALQHMTDFAIQFNKNSFGVIPSTPLAIHTPLMPNQSIDVSLPLNTLGPVMKMEPLN
NLQVAVKNNIDVFYFSLIPLNVLFVEDGKMERQVFLATWKDIPNENELQFQIKECHLNADTVSSKLQN
NNVYTIAKRNVEGQDMLYQSLKLTNGIWILAEELRIQPGNPNYTLCLKRAPEVSQYIYQVYDSILKN-
Stop

human β 2 adaptin 700-937Stop (protein thermal shift assay)

IGMAPGGYVAPKAVWLPAVKAKGLEISGTFTHRQGHYMEMNFTNKALQHMTDFAIQFNKNSFGVIPS
TPLAIHTPLMPNQSIDVSLPLNTLGPVMKMEPLNNLQVAVKNNIDVFYFSLIPLNVLFVEDGKMERQVF
LATWKDIPNENELQFQIKECHLNADTVSSKLQNNNVYTIAKRNVEGQDMLYQSLKLTNGIWILAEELRIQ
PGNPNYTLCLKRAPEVSQYIYQVYDSILKN-Stop

Article 3

A biosensor to monitor dynamic regulation and function of tumour suppressor PTEN in living cells.

Évelyne Lima-Fernandes, Stanislas Misticone*, Cédric Boularan*, **Justine S. Paradis***, Hervé Enslen, Philippe P. Roux, Michel Bouvier, Georges S. Baillie, Stefano Marullo et Mark G. Scott. (***Contributions équivalentes des auteurs**)

Publié dans *Nature Communications*, le 16 juillet 2014

Résumé

Le suppresseur de tumeur PTEN est une phosphatase qui régule négativement la voie PI3K/Akt. La possibilité de mesurer de manière directe, rapide et sensible la conformation et la fonction de PTEN est une étape clé dans le développement de nouveaux médicaments contre le cancer, ciblant une restauration des voies dépendantes de PTEN. Dans cette étude, nous avons développé un biosenseur intramoléculaire basé sur la technique de BRET, capable de détecter les changements de conformations induits par différents stimuli cellulaires. Ce biosenseur conserve les caractéristiques intrinsèques de PTEN, ce qui permet des études structures/fonction et des analyses cinétiques. Des variations dans le signal de BRET, traduisant un changement conformationnel, sont détectées à la suite de mutations qui perturbent les interactions intramoléculaires de PTEN et favorisant sa translocation à la membrane plasmique, et après activation physiologique de PTEN. En utilisant ce biosenseur comme rapporteur, nous avons démontré l'activation de PTEN par plusieurs RCPG, qui n'avaient jamais été rapportés comme étant des modulateurs de PTEN. Le Trastuzumab, utilisé dans le traitement des cancers du sein sur-exprimant le récepteur ERBB2, entraîne aussi un réarrangement conformationnel de PTEN associé à son activation. Nous proposons que ce biosenseur puisse être utilisé pour l'identification de nouvelles voies de signalisation régulant PTEN, ou bien de molécules permettant d'améliorer ou de rétablir son activité anti-tumorale.

Contributions

Dans cette étude, j'ai contribué au design expérimental et à la génération des résultats qui démontrent par BRET le changement conformationnel de PTEN après activation de plusieurs RCPG ; ainsi qu'aux expériences montrant l'activation de PTEN suite à l'expression de β -arrestine ou d'un mutant constitutivement actif, RhoV14. J'ai aussi participé à la relecture du manuscrit avant soumission, sans cependant en être l'auteure principale.

A Biosensor to monitor Dynamic Regulation and Function of Tumour Suppressor PTEN in Living Cells

Evelyne Lima-Fernandes^{1,2,3,6}, Stanislas Misticonne^{1,2,3,*}, Cédric Boullaran^{1,2,3,*}, **Justine S. Paradis**^{4,*}, Hervé Enslin^{1,2,3}, Philippe P. Roux⁴, Michel Bouvier⁴, George S. Baillie⁵, Stefano Marullo^{1,2,3} & Mark G.H. Scott^{1,2,3,¶}

¹ : *Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France*

² : *CNRS, UMR8104, Paris, France*

³ : *Univ. Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France*

⁴ : *Molecular Biology Program, Department of Biochemistry, Department of Pathology and Cell Biology, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal (QC), H3C 3J7, Canada*

⁵ : *Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK*

⁶ *Current address: Structural Genomics Consortium, University of Toronto, Toronto, Canada*

*Equal contribution

¶ Corresponding author: mark.scott@inserm.fr

Address :

INSERM U1016 - Institut Cochin

27, Rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

Tel: +33 1 40 51 65 48 - Fax: +33 1 40 51 65 35

Abstract

Tumour Suppressor PTEN is a phosphatase that negatively regulates the PI3K/AKT pathway. The ability to directly monitor PTEN conformation and function in a rapid, sensitive manner is a key step towards developing anti-cancer drugs aimed at enhancing or restoring PTEN-dependent pathways. Here, we developed an intramolecular bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensor, capable of detecting signal-dependent PTEN conformational changes in live cells. The biosensor retains intrinsic properties of PTEN, enabling structure-function and kinetic analyses. BRET shifts, indicating conformational change, were detected following mutations that disrupt intramolecular PTEN interactions, promoting plasma membrane targeting, and also following physiological PTEN activation. Using the biosensor as reporter we uncovered PTEN activation by several G protein-coupled receptors, previously unknown as PTEN regulators. Trastuzumab, used to treat ERBB2-overexpressing breast cancers, also elicited activation-associated PTEN conformational rearrangement. We propose the biosensor can be used to identify pathways regulating PTEN or molecules that enhance its anti-tumour activity.

Introduction

Tumour Suppressor PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) is a lipid phosphatase that dephosphorylates phosphatidyl (3,4,5) trisphosphate (PIP3) and thus inhibits PI3K/AKT signalling. By opposing the PI3K/AKT pathway, PTEN regulates cell proliferation, survival and migration. Loss of PTEN function occurs in a broad range of human cancers, and it is often mutated in inherited cancer-predisposition syndromes such as Cowden disease¹⁻³. In cultured cells, deletion of the *PTEN* gene, or reduction of PTEN levels using RNA interference, leads to increased PIP3-dependent AKT activation. *In vivo* studies have also addressed the importance of PTEN in the development of cancer. Whereas homozygous deletion of *Pten* leads to early embryonic death, *Pten* +/- mice develop various cancers and also a lethal lymphoproliferative disease⁴. Furthermore, studies employing genetic manipulation of *Pten* to produce a series of mice carrying different combinations of wild-type, null and hypomorphic alleles, have demonstrated that subtle reductions in *Pten* levels are sufficient to promote cancer susceptibility^{5,6}.

Regulation of PTEN levels, localization and activity are subject to tight control. PTEN expression is controlled by numerous transcription factors (e.g. p53, Egr-1 and CBF-1) and post-transcriptionally via oncogenic microRNAs (miRNAs) that target *PTEN* mRNA^{1,2}. Recently, it was shown that both mRNAs of the *PTEN* pseudogene, *PTENP1*, and competing endogenous RNAs (ceRNAs) could serve as decoys for *PTEN* mRNA-targeting miRNAs, inhibiting their effects on PTEN expression^{7,8}. PTEN is also regulated through protein-protein interactions, the association of scaffolding proteins such as MAGI-1 & -2, NHERF and β -arrestins (β -arrests) altering its function and/or subcellular localization⁹⁻¹². Finally, PTEN catalytic activity is regulated post-translationally by phosphorylation, acetylation, SUMOylation and ubiquitination^{2,13}.

Phosphorylation is the best-characterised post-translational mechanism of PTEN regulation. The PTEN protein is composed of a short N-terminal PIP2-binding motif, a catalytic domain, C2 domain and a regulatory C-terminal tail^{1,14}. A cluster of serine and threonine residues (Ser380, Thr382, Thr383 and Ser385) in the regulatory C-terminal tail of PTEN is constitutively phosphorylated by casein kinase 2 (CK2). This results in a stable “closed” form that has reduced lipid phosphatase activity, decreased plasma membrane targeting, and increased conformational

compaction¹⁵⁻¹⁹. Intramolecular interaction of the phosphorylated C-terminal tail with basic residues within the N-terminal PIP2 binding motif, the catalytic and C2 domains, maintains PTEN in its “closed” form^{20,21}. Mutation of the C-terminal tail phosphorylation cluster disrupts the intramolecular interaction and promotes an “open” form of PTEN with increased catalytic activity and plasma membrane targeting. These findings have led to an elegant model whereby a phosphorylation-regulated switch controls the transition of PTEN from a “closed” cytoplasmic inactive state and an “open” active state that is localized to the plasma membrane^{17,19,21}. PTEN is also phosphorylated in its C2 domain by ROCK, the downstream effector of RhoA, resulting in increased PTEN catalytic activity²². Finally, PTEN function can be inhibited by phosphorylation on tyrosine residues by Src family kinases^{23,24}. Phosphorylation of tyrosine residues, in the C2 domain, are thought to inhibit binding of PTEN to cellular membranes, thus leading to increased PI3K/AKT signalling^{23,24}.

Downregulation of PTEN activity in human cancers can occur via posttranslational modification, in the absence of any *PTEN* gene alteration. For example, in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), PTEN is mostly inactivated by phosphorylation and oxidation, resulting in hyperactivation of the PI3K/AKT pathway²⁵. Pharmacological manipulation of the posttranslational mechanisms inactivating PTEN restored PTEN activity and inhibited PI3K/AKT signalling in T-ALL cells²⁵. The ability to directly monitor PTEN, in a rapid and sensitive manner, is a key issue to speed the development of anti-cancer drugs aimed at enhancing or restoring PTEN-dependent cellular pathways. Indeed, direct measurement of PTEN activity can currently only be assessed by enzymatic end point assays in cell lysates. We have therefore developed an intramolecular bioluminescent resonance energy transfer (BRET)-based biosensor that can be used in intact live cells to detect conformational changes of PTEN. Using the biosensor we were able to detect conformational rearrangement of PTEN induced by (i) targeted mutation of phosphorylation sites affecting key intramolecular interactions as well as cancer-associated mutations ablating major mono-ubiquitination sites (ii) modulation of signalling pathways that impact PTEN function, including novel GPCR-mediated regulation, and (iii), the therapeutic agent trastuzumab, used in the treatment of ERBB2-overexpressing breast cancers.

Results

Establishment and validation of the Rluc-PTEN-YFP Biosensor

Biosensors based on intramolecular resonance energy transfer (RET) detect molecular proximity between donor and acceptor molecules at the nanometer scale²⁶. Changes in intramolecular RET, depending on the relative orientation of the donor and acceptor proteins in the fusion, permit the monitoring of conformational changes in the “test” protein sandwiched between the donor/acceptor couple^{26,27}. To determine if changes in PTEN conformation can be followed in live cells, we set up an intramolecular bioluminescence RET (BRET)-based biosensor, comprising the energy donor, Rluc, fused to the N-terminus of PTEN and the energy acceptor, YFP, fused to the C-terminus of PTEN (Fig. 1a). Importantly, the lipid phosphatase catalytic activity of PTEN in the Rluc-PTEN-YFP biosensor remained intact, as shown by an *in vitro* assay that measures free phosphate released from PIP3 (Fig. 1b). PTEN-null prostate cancer PC-3 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP were lysed and catalytic activity of immunoprecipitated PTEN measured. Lipid phosphatase activity of the PTEN biosensor was assessed by measurement of released phosphate from PIP3, YFP-transfected cells serving as control (Fig. 1b). As the lipid phosphatase activity of PTEN antagonizes the PI3K/AKT signalling pathway, through conversion of PIP3 to PIP2, we next tested the functional activity of the biosensor using AKT activation as readout. Expression of Rluc-PTEN-YFP in PC-3 cells resulted in decreased AKT activation as indicated by reduced pAKT levels compared to empty vector-transfected cells (Fig. 1c). This was comparable to a Myc-tagged form of PTEN and PTEN-YFP expressed at similar levels (Fig. 1c). In addition, Rluc-PTEN-YFP displayed a similar cellular distribution to PTEN-YFP when imaged in live HEK cells, being found mainly in the cytoplasm, but also in the nucleus (Fig. 1d), consistent with previous reports²¹. Finally, Rluc-PTEN-YFP retained the capacity to interact with protein partners as shown by the coimmunoprecipitation of the molecular scaffold β -arr2¹¹ with the biosensor (Fig. 1e). Taken together, these results indicate that PTEN maintains its functional repertoire within the Rluc-PTEN-YFP biosensor.

In HEK cells expressing Rluc-PTEN-YFP, addition of the membrane-permeable substrate for Rluc, coelenterazine *h*, elicited a strong basal BRET signal (approximately 300 mBRET) indicating molecular proximity of the donor and acceptor in the biosensor (Fig. 2a).

To eliminate the possibility that the signal detected could be due to intermolecular BRET between adjacent Rluc-PTEN-YFP molecules, we measured the BRET signal obtained with separate Rluc-PTEN and PTEN-YFP fusion proteins. Cells coexpressing Rluc-PTEN and PTEN-YFP at equivalent luminescence and fluorescence levels (Supplementary Fig. 1a and b) as those obtained with Rluc-PTEN-YFP gave a minimal basal BRET (Fig. 2a), indicating that the signal detected with Rluc-PTEN-YFP does indeed reflect intramolecular BRET. We next tested if BRET could be detected in cells expressing “physiological” levels of the PTEN biosensor. For this, we transfected PTEN-null PC-3 cells with Rluc-PTEN-YFP to levels approximating endogenous levels of PTEN in HEK cells, with over 30% of PC-3 cells transfected under these conditions (Fig. 2b and Supplementary Fig. 1c). Using this approach we were able to detect a BRET signal (Fig. 2a), indicating that the biosensor can indeed be used at “physiological” expression levels. As expected for the donor and acceptor being contained in the same molecule, the BRET signal remained stable with increasing Rluc values over a greater than 100-fold range (Fig. 2c and d), due to the constant acceptor to donor ratio²⁸.

Rluc-PTEN-YFP reports PTEN functional change in live cells

Phosphorylation of PTEN in its C-terminal tail on residues Ser380, Thr382, Thr383 and Ser385 (Fig. 3a) favours the closed, predominantly cytoplasmic, form of PTEN¹⁶⁻¹⁸. Dephosphorylation of these residues promotes an open, active form of PTEN that is targeted to the plasma membrane. As reported previously²¹, the C-terminal tail of PTEN (PTEN-tail, amino acids 356-403) can be co-immunoprecipitated with a truncated form of PTEN lacking the C-terminal tail (PTEN- Δ tail, amino acids 1-355) (Supplementary Fig. 2a). Mutation of the phosphorylation cluster to alanine residues (Ser380Ala, Thr382Ala, Thr383Ala and Ser385Ala) results in loss of binding between PTEN- Δ tail and PTEN-tail (Supplementary Fig. 2a). Furthermore, whereas full-length PTEN does not associate with a coexpressed C-terminal tail, a full-length form of PTEN mutated in its phosphorylation cluster (PTEN-A4) is able to associate with the tail (Supplementary Fig. 2b). These data are consistent with the proposed model of a phosphorylation-dependent intramolecular interaction between amino acids 356-403 in the PTEN C-tail and residues contained within amino acids 1-355 of PTEN- Δ tail.

To determine whether PTEN conformational changes can be monitored in live cells, we introduced Ser380Ala, Thr382Ala, Thr383Ala and Ser385Ala mutations in the biosensor (Rluc-

PTEN(A4)-YFP) (Fig. 3a). Strikingly, mutation of all four phosphorylation residues within Rluc-PTEN-YFP produced a marked reduction in the BRET signal (greater than 50%), compared to wild-type PTEN, indicating increased distance and or/altered orientation of Rluc and YFP relative to each other (Fig. 3b-d). This change is consistent with the “opening” of the PTEN molecule upon dephosphorylation of its carboxyterminal tail in live HEK cells. The change in BRET signal observed with Rluc-PTEN(A4)-YFP was associated with increased targeting to the plasma membrane in live HEK cells (Fig. 3e). A similar decrease in BRET with Rluc-PTEN(A4)-YFP was observed in HeLa cells (Fig. 3f). Again, this was associated with enhanced membrane targeting as assessed by increased colocalization of YFP signal with red fluorescent-labelled lectin, wheat germ agglutinin (WGA), on non-permeabilized cells (Fig. 3g and h). These data demonstrate that conformational change of PTEN can be monitored in live cells using the biosensor.

Pathways controlling PTEN are detected by Rluc-PTEN-YFP

We next examined if signalling pathways known to regulate PTEN activity would induce BRET changes in cells expressing Rluc-PTEN-YFP. The serine-threonine kinase CK2 is involved in phosphorylation of the regulatory sites in the C-terminus of PTEN. CK2 overexpression has been observed in several different types of cancer^{25,29-31}. For example, in human T-ALL, CK2 is overexpressed leading to phospho-dependent PTEN inactivation and subsequent hyperactivation of the PI3K/AKT pathway²⁵. Pharmacological inhibition of CK2 restored PTEN activity and inhibited PI3K/AKT signalling in T-ALL cells²⁵. We examined whether incubation of cells with the CK2 inhibitor, tetrabromobenzotriazole (TBB), could modulate the BRET signal of Rluc-PTEN-YFP (Fig. 4a-c). For this, we transfected PC-3 cells with the PTEN biosensor and incubated cells overnight with the CK2 inhibitor. Consistent with our results using the C-terminal mutants above, TBB elicited a significant decrease in BRET ($p < 0.001$, $n = 4$, t test), which paralleled a significant decrease ($p < 0.05$, $n = 4$, t test) in phosphorylation of Ser380/Thr382/Thr383 as assessed with a specific phospho-PTEN antibody against these sites (Fig. 4a-c). Cells incubated with TBB also displayed decreased pAKT levels (Fig. 4d and e) consistent with previous reports²⁵. In a converse approach to CK2 inhibition we next assessed the effect of co-expressed HA-tagged CK2 on the biosensor. Interestingly, HA-CK2 elicited a significant increase ($p < 0.001$) above baseline BRET of the biosensor (Fig. 4f) as

opposed to the decrease observed with TBB. These results indicate that both positive and negative modification of signalling pathways that impact on PTEN function can be detected using the biosensor in live cells.

We next investigated the effect of the RhoA/ROCK pathway on Rluc-PTEN-YFP as the small GTPase RhoA is known to stimulate PTEN activity via its downstream effector ROCK^{11,22,32}. We coexpressed the PTEN biosensor with a constitutively active form of RhoA (RhoA-V14). RhoA-V14 produced a robust decrease in BRET compared to vector-transfected cells (Fig. 5a) indicating conformational change, and activation of the biosensor, as shown by *in vitro* phosphatase assay (Fig 5b) as well as reduced pAKT levels in cells (Fig. 5c). We recently showed that β -arrs bind directly and activate PTEN lipid phosphatase activity and that this occurs downstream of RhoA/ROCK signalling¹¹. We thus tested the effect of β -arr2 on PTEN conformation using the biosensor. Coexpression of Rluc-PTEN-YFP with β -arr2 induced both a reduction in BRET and increased lipid phosphatase activity (Fig. 5 d and e). We also made use of β -arr2^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) for effects on the biosensor. Compared to wild-type counterparts, β -arr2^{-/-} MEFs demonstrated increased PTEN biosensor BRET and this was associated with increased pAKT signalling (Fig. 5f and g). The findings above demonstrate that the biosensor can be used as readout for conformational change associated with PTEN activation status, following modulation of signalling pathways or interaction with PTEN-binding partners.

Rluc-PTEN-YFP uncovers novel GPCR-mediated PTEN regulation

Only a handful of receptors are currently known to physiologically regulate PTEN. One of these is the sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1PR2), which belongs to the G protein-coupled receptor (GPCR) family. The S1PR2 stimulates PTEN activity downstream of a RhoA-dependent pathway to inhibit cell migration³³. While the S1PR2 can stimulate PTEN activity in HEK cells, the related S1PR1 isoform was found to be without effect on PTEN activation³³. We took advantage of these findings to test if the lipid S1P acting at either the S1PR1 or S1PR2 expressed at equivalent levels (Supplementary Fig. 3) could promote changes in PTEN conformation. HEK cells cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and either S1PR1 or S1PR2 were incubated with S1P and BRET signals measured. Remarkably, whereas S1P (not vehicle alone) produced a change in BRET signal of Rluc-PTEN-YFP in S1PR2-expressing cells, S1P

remained without effect in S1PR1-expressing cells (Fig. 6a). Similar BRET results were obtained in HeLa cells (Fig. 6b). While the BRET experiments were performed with transfected receptors to bias signalling via the expressed receptor, we also pre-incubated untransfected HeLa cells, that endogenously express S1PR1 and S1PR2, with the specific S1PR2 antagonist and found that this led to increased AKT activation following incubation of cells with S1P (Fig. 6c). This is consistent with S1PR2-specific release of a PTEN-mediated brake on PI3K/AKT signalling in this cell model.

We next used Rluc-PTEN-YFP as a screening tool in an attempt to uncover additional GPCRs capable of modulating PTEN function. As the S1PR2 activates PTEN via a RhoA-dependent pathway³³ we tested several other GPCRs, known to stimulate RhoA-dependent signalling in HEK cells but that have not been reported so far to modulate PTEN activity in this system. The Angiotensin Type 1A receptor (AT1AR) has previously been shown to activate RhoA in HEK cells³⁴⁻³⁶. We first confirmed that the AT1AR can activate the Rho/ROCK pathway in HEK cells using an *in vitro* assay that measures ROCK activity. Following activation of the receptor by angiotensin II, cells were lysed, ROCK was immunoprecipitated and incubated with purified myosin phosphatase target subunit (MYPT), as substrate, in the presence of ATP. Increased pMYPT levels were observed following stimulation of the receptor, reflecting the activation of the RhoA/ROCK pathway (Fig. 7a). Cells were next cotransfected with the AT1AR and Rluc-PTEN-YFP, and incubated with angiotensin II. Ligand-induced conformational change of PTEN was illustrated by a significant decrease ($p < 0.001$, $n = 5$, ANOVA with Bonferroni post hoc test) in BRET at 5, 10 and 20 minutes incubation with angiotensin II compared to vehicle treated cells (Fig. 7b). PTEN catalytic activity was found to increase over the same time-frame using an *in vitro* phosphatase assay conducted in parallel (Fig. 7c and Supplementary Table 1a). Further evidence in favour of PTEN activation downstream of the AT1AR was also provided using a siRNA approach to reduce PTEN levels. In control cells transfected with non-targeting siRNA, stimulation of the AT1AR by angiotensin II led to increased pAKT levels (Fig. 7d). Reduction of PTEN levels by siRNA led to increased basal pAKT levels, which were further increased upon AT1AR activation (Fig. 7d). Taken together the above results suggest a novel negative feedback loop on PI3K/AKT signalling and imply that PTEN activation can be triggered downstream of the AT1AR.

BRET can monitor changes in energy transfer in real-time²⁷. We therefore next assessed the kinetics of changes in intramolecular BRET with Rluc-PTEN-YFP, following stimulation of the AT1AR in real-time by monitoring the same cell population and taking BRET measurements every minute. Using this approach, Angiotensin II induced a time-dependent decrease in BRET over a 20min time period, whereas no decrease in BRET was observed in control cells incubated with vehicle alone (Fig. 7e). A dose-response experiment was also performed (Fig. 7f) with varying Angiotensin II concentrations at a fixed time point (10 min) and the obtained EC50 of 1.39nM agrees well with data measuring EC50 values of Angiotensin II on other downstream signalling events³⁷. Pretreatment of cells with the ROCK inhibitor Y27632 enhanced the BRET signal above baseline levels (+37mBRET) and abolished the time-dependent decrease in BRET following Angiotensin II stimulation (Fig. 7g and h), demonstrating that activation of the biosensor occurs as a consequence of a cellular signalling cascade that regulates PTEN. In agreement with this, maximal AT1AR-induced pAKT levels at both Thr308 and Ser473 sites were higher following pretreatment of cells with Y27632 (Fig. 7i-j).

We subsequently tested two other GPCRs, the Thromboxane A2 receptor (TP α R) and the muscarinic M1 receptor (M1MR) known for their capacity to activate RhoA in HEK cells^{38,39}. Following activation, both receptors produced significant shifts ($p < 0.001$, $n = 5$) in BRET signal of Rluc-PTEN-YFP (Fig. 8a and b). Reduction of PTEN levels by siRNA led, in both cases, to higher pAKT levels following agonist stimulation, indicating that PTEN activity limits the PI3K/AKT pathway downstream of TP α R and M1MR signalling (Fig. 8c and d). Interestingly, in agreement with our findings here, TP α R was reported to activate PTEN in endothelial cell systems⁴⁰. The above data provide proof of principle that receptor-mediated physiological regulation of PTEN can be detected using the PTEN biosensor.

Monitoring PTEN function upon therapeutic agent treatment

To determine if therapeutic agents that impact on PTEN function can be monitored using this biosensor, we tested for the effect of Trastuzumab, a rationally designed targeted treatment for certain breast cancer patients⁴¹. Trastuzumab is a humanized antibody targeting ERBB2 that displays therapeutic efficacy in certain patients with ERBB2-overexpressing breast tumours.

PTEN has been reported to contribute to the antitumour activity of trastuzumab⁴², patients harbouring PTEN-deficient breast cancers showing significantly poorer responses to this antibody than those with normal PTEN. Acute trastuzumab treatment of breast cancer cell lines overexpressing endogenous ERBB2, results in increased membrane association and phosphatase activity of PTEN with consequent downregulation of pAKT levels⁴². We expressed Rluc-PTEN-YFP in SKBR3 breast cancer cells, which express high levels of endogenous ERBB2, and in MCF7 cells, which do not (Fig. 9a). Incubation of SKBR3 cells with trastuzumab resulted in decreased BRET signals, which was maximal at 20mins (Fig. 9a). The change in BRET signal coincided with increased PTEN activity (Fig. 9b and Supplementary Table 1b) and decreased cellular pAKT levels (Fig. 9c). Incubation of MCF-7 cells with trastuzumab did not result in any significant change in BRET compared to baseline values, suggesting that the effect of trastuzumab in SKBR3 cells does indeed pass through ERBB2 (Fig. 9a). To further confirm the specificity of the response obtained with the biosensor, we used MCF-7 cells stably transfected with either full-length ERBB2 or p95-ERBB2, an amino-terminally truncated receptor that is found in some tumours and that cannot bind to trastuzumab⁴³. A 20 minutes incubation with trastuzumab caused a change in BRET signal in full-length ERBB2-expressing cells but no change was observed in the p95-ERBB2-expressing cells lacking the trastuzumab-binding extracellular domain (Fig. 9d). These data illustrate the specificity of the biosensor, showing that while trastuzumab acting through the full-length ERBB2 receptors impacts PTEN, the p95-ERBB2 receptor that is refractory to trastuzumab does not.

Combined, the above data demonstrate that changes in BRET signal from the PTEN biosensor can reflect intramolecular conformational rearrangement that correlates with PTEN activation following physiological or therapeutic receptor engagement.

Discussion

The Rluc-PTEN-YFP biosensor described here can be used to rapidly detect conformational rearrangements of PTEN in intact cells and in real-time, including those during its activation. Importantly, the biosensor retains PTEN catalytic activity and thus the capacity to downregulate the PI3K/AKT pathway, as well as displaying its expected cellular localization. A strong and stable intramolecular BRET was detected over a 100-fold range in expression, demonstrating the robustness of the biosensor. Moreover, BRET signals of Rluc-PTEN-YFP were detected at physiologically relevant levels of expression, following reconstitution of PTEN-null cells with the biosensor, to those that approximate endogenous expression in other PTEN-containing cells, highlighting its sensitivity. Receptors previously shown to be without effect on PTEN function did not produce changes in biosensor signal, demonstrating its specificity. We were also able to use Rluc-PTEN-YFP in a reporter role to uncover novel GPCR-mediated regulation of PTEN. Furthermore, activation-associated changes in Rluc-PTEN-YFP signal could be modulated pharmacologically with compounds targeting signalling pathways that impact PTEN function or by modifying therapeutic target receptor levels, as in the case of cell lines expressing different levels of ERBB2. However, because conformational changes detectable with the biosensor do not always necessarily reflect PTEN activation, for every new experimental set up BRET data need to be matched with additional tests, such as subcellular localization of PTEN or determination of active AKT levels.

We used Rluc-PTEN-YFP in several different ways to investigate cellular and molecular mechanisms controlling the PTEN pathway. The biosensor was used in a structure-function mode to investigate if mutation of amino acids implicated in the regulation of PTEN function results in conformational change in live cells. We demonstrated this by mutation of key amino acids in the C-terminal tail, known to be important for conformational rearrangement of PTEN, which also result in changes in its membrane targeting/cellular activity and found shifts in BRET signals of the biosensor, indicative of conformational change. Furthermore, we showed that pharmacological inhibition of CK2 caused changes in wild-type PTEN biosensor BRET signal that paralleled dephosphorylation of the regulatory C-terminal residues. This is of particular interest given that CK2 inhibition has been shown to restore PTEN-dependent signalling in cancer cell systems and has been suggested as a potential research avenue for T-ALL treatment

²⁵. Our data validate experimentally, in living cells, the proposed model of a PTEN switch between an open/active conformation targeted to the plasma membrane and a closed/less active cytoplasmic state ^{17,21}. The importance of PTEN membrane localization is highlighted by studies showing that certain cancer-associated mutations do not display reduced catalytic activity *in vitro* but instead affect membrane localization ⁴⁴. The impaired plasma membrane binding of these mutants results in a PTEN-null phenotype in cells. The biosensor could, therefore, be used to probe the effects of other amino acids implicated in PTEN control, such as those that are the target of other post-translational modifications, in addition to assessing the effect of cancer-derived mutations on conformation. To provide an example of this, we investigated mutations that have previously been shown to ablate major mono-ubiquitination sites in PTEN. K13 in PTEN is mutated to glutamic acid (K13E) in spontaneous cancer ⁴⁵ and K289 mutated to glutamic acid (K289E) is associated with Cowden syndrome ^{46,47}. These sites are found on unstructured regions of PTEN ¹⁴ (Supplementary Fig. 5a and b) and were both identified as major monoubiquitination sites that are important for nuclear import of PTEN ⁴⁶. Introduction of the K13E/K289E mutations in the Rluc-PTEN-YFP caused a change in BRET signal indicative of conformational change (Supplementary Fig. 5). This indicates that in addition to reporting on phosphorylation-related changes in PTEN function, the BRET reporter can also be used to probe conformational changes associated with other post-translational modifications.

The biosensor was also used to assess whether PTEN-protein partner interactions and/or important intracellular signalling proteins can induce PTEN conformational changes. As proof of concept, RhoA and β -arr2, known to activate PTEN ^{11,22}, both promoted changes in PTEN conformation in live cells. PTEN has a number of protein-binding partners that are required for its cellular functions and plasticity ^{1,48-51}. Previously characterized or candidate PTEN-protein partners that may form part of the PTEN interactome, as well as signalling proteins that may affect PTEN function, can therefore be rapidly assessed for their effect on PTEN conformation change by simple coexpression with Rluc-PTEN-YFP in live cells. It should be noted that a subset of PTEN partners that interact with PTEN through its C-terminal PDZ-binding sequence are likely not adapted to this approach due to the C-terminal fusion of YFP.

The biosensor proved to be valuable in monitoring PTEN conformational change in real-time kinetic experiments in live cells, following incubation with therapeutic agents or physiological ligands that target cell surface receptors. Src is known to interact with ERBB2

and is therefore activated in ERBB2-overexpressing cancer cells⁵². PTEN function is inhibited by phosphorylation on tyrosine residues by Src family kinases^{23,24}. The ERBB2-targeting antibody, trastuzumab, used in the treatment of certain breast cancers^{41,42} induces PTEN membrane targeting and phosphatase activity by reducing PTEN tyrosine phosphorylation via Src inhibition⁴². We showed that trastuzumab, caused a time-dependent change in Rluc-PTEN-YFP BRET that coincided with PTEN activation. The specificity of this signal was demonstrated by performing control experiments in cells that do not overexpress endogenous ERBB2, or in cells overexpressing a variant of the ERBB2 receptor, ERBB2-p95, that lacks the trastuzumab-binding extracellular domain⁴³. We also probed the effect of several GPCRs for their effects on the biosensor. Whereas the lipid S1P was able to change the BRET signal of the biosensor through the S1PR2, it was without effect on the S1PR1 isoform, in agreement with previous finding that S1PR2, but not S1PR1, activates PTEN in HEK cells³³. Using the same strategy we were also able to identify three other GPCRs (AT1AR, TP α R and M1MR) that can activate PTEN. These experiments therefore provide proof of principle that the biosensor can be used to uncover additional cell surface receptors that influence PTEN function and provide a strategy for the identification of other potential physiological/therapeutic receptor targets. Finally, as the biosensor can be used as a rapid, direct and sensitive means to detecting activation of PTEN catalytic activity, it could therefore be used as readout for screening of small molecules that enhance or restore PTEN signal transduction. The identification of such agents would be potentially useful to manipulate PTEN signalling in a wide panel of human cancers.

Methods

Plasmids and reagents

Rluc-PTEN-YFP plasmid was generated by sequentially subcloning the coding sequence of Rluc in-frame at the N-terminus and YFP at the C-terminus of PTEN, yielding a Rluc-PTEN-YFP with flexible spacers of 18 aa between Rluc and PTEN, and 7 aa between PTEN and YFP. The sequential strategy allowed the generation of Rluc-PTEN and PTEN-YFP control vectors. Point mutations of PTEN in Rluc-PTEN-YFP were introduced by Quickchange (Stratagene) site-directed mutagenesis (PTEN-K13E/K289E) or by subcloning mutant PTEN (PTEN-A4) from previously characterized vectors. K13E was generated with the following primers: 5'-GTTAGCAGAAACGAAAGGAGATATCAAGAG-3' (sense) and 5'-CTCTTGATATCTCCTTTCGTTTCTGCTAAC-3' (anti-sense). K289E was generated with the following primers: 5'-GAAACCTCAGAAGAAGTAGAAAATGGA-3' (sense) and 5'-TCCATTTTCTACTTCTTCTGAGGTTTC-3' (antisense). Myc-PTEN, Myc-PTEN-A4, Myc-PTEN Δ tail (1-355), Myc-RhoA-V14 constructs in the pRK5 vector were kind gifts of Alan Hall (MSKCC, New York). PTEN-tail (356-403)-YFP constructs were generated by amplifying the PTEN C-terminal tail by PCR and inserting the products into the pEYFP-N1 plasmid. All constructs were verified by sequencing (Institut Cochin Sequencing Facility). S1PR1, S1PR2 and TP α R were obtained from Missouri S&T cDNA resource center. CK2 plasmid was obtained from David Litchfield (University of Western Ontario) via Addgene and has been described previously⁵³. AT1AR and M1MR have been described previously (Scott et al., 2006). The antibodies pAKT, total AKT, phospho PTEN (Ser380/Thr382/Thr383), PTEN (138G6), Myc (71D10), β -arr1/2 (D24H9), HA (C29F4) and GAPDH were from Cell signalling, PTEN mAb clone 6H2.1 was from Millipore, GFP and Myc (9E10) were from Roche, anti-c-erbB2 (clone e2-4001) was from Thermo Scientific, tubulin and actin were from Santa Cruz, and FLAG was from Sigma. All antibodies were used at 1/1000 dilution for Western blots apart from anti-PTEN (138G6) and anti- β -arr1/2, which were used at 1/5000 dilution. ROCK inhibitor Y27632, Carbachol and Angiotensin II were from Sigma, U46619 and JTE103 were from Cayman Chemical. Wheat Germ Agglutinin (WGA)-Texas Red conjugate was from Molecular Probes. Rho Kinase assay kit was from Cell Biolabs and Trastuzumab was kindly provided by

Genentech. MCF-7 HER2 and p95 HER2 cells lines were a kind gift from Maurizio Scaltriti (Harvard Medical School).

Cell culture and transfection

All cell lines were obtained from the ATCC. HEK293T, HeLa and MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. PC-3 cells were maintained in RPMI supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. SKBR3 cells were transfected with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin. HEK293T and HeLa cells were transfected using GeneJuice (Novagen), SKBR3, MCF-7 and PC-3 cells with Fugene HD (Promega). Co-transfection of plasmids and siRNA in HeLa cells was performed using Dharmafect Duo. 1 μ g of plasmid and 100nM final concentration of siRNA duplexes were used per well of a 12-well plate.

PTEN phosphatase assay

Phosphatase assays were performed as described previously¹¹. Briefly, cells were transfected with either Rluc-PTEN-YFP or YFP vector and the indicated plasmids, lysates immunoprecipitated using an anti-PTEN antibody (Millipore) or an anti-GFP antibody (Roche) and incubated 45 minutes at 37°C with 100 μ M water-soluble di-C8-PIP3 (Echelon Biosciences). Released phosphate was measured by optical density at 620 nm using Biomol green reagent (Enzo Life Sciences). YFP Vector control values were subtracted and samples normalized to PTEN alone.

Endogenous ROCK activity assay

ROCK activity in cell lysates was measured using a kit from Cellbiolabs according to the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation and immunoblotting

For co-immunoprecipitations of β -arrestin with Rluc-PTEN-YFP cells were lysed in buffer containing 50mM Hepes (pH 7.4), 250mM NaCl, 2mM EDTA, 0.5% NP-40, 10% glycerol

supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche) as used for previous β -arrestin interaction studies^{21,54,55}. For co-immunoprecipitations of PTEN-tail fusions with PTEN- Δ tail, HEK293T cells expressing relevant plasmids were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.1% Nonidet P-40 supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). For both IP protocols lysates were cleared by centrifugation at 13,000rpm for 15 minutes at 4°C. Supernatants were added to washed EZview Red Myc affinity beads (Sigma). Bound proteins were washed 2-4 times in lysis buffer and beads resuspended in laemmli buffer. Immunoprecipitated proteins were subsequently detected by Western blot. Representative examples of uncropped Western blots are included in Supplementary Information (Supplementary Figure 6).

Immunofluorescence

Fluorescence microscopy was carried out using a Leica spinning-disk microscope with a x63 oil immersion lens, equipped with a CoolSnap HQ2 CCD camera. Live images were acquired from HEK cells growing on 35mm μ -dishes (Ibidi). HeLa cells were grown on glass coverslips for immunofluorescence and PC-3 cells were grown in Ibidi 4-well chambers.

BRET assays

BRET assays were performed as described previously^{27,28,56}. Briefly, 24h post-transfection, cells were detached with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen) and distributed in white 96-well optiplates (Perkin Elmer). Coelenterazine h (Interchim) was added to a final concentration of 5 μ M, and incubated for 3 minutes at 25°C. BRET readings were collected using a Multilabel Reader Mithras LB 940 (Berthold Technologies). Substrate and light emissions were detected at 480 nm (Rluc) and 540 nm (YFP) for 1 second. The BRET signal was calculated by ratio of the light emitted by YFP and the light emitted by Rluc (YFP/Rluc). The ratio values were corrected by subtracting background BRET signals detected when Rluc-PTEN was expressed. mBRET values were calculated by multiplying these ratios by 1000. For receptor stimulation assays with adherent cells, HEK cells were seeded in white 96-well culture plates (Perkin Elmer) 24h prior to transfection. Cells were transfected with the indicated plasmids 24h after seeding. 8h after transfection, cells were starved in DMEM without serum. 24h after transfection, medium was replaced by HBSS supplemented with 10 mM Hepes.

Coelenterazine h was added to a final concentration of 5 μ M, and incubated for 3 minutes at 25°C. The appropriate concentration of ligand was added after incubation and readings were collected immediately.

Flow cytometry

HeLa cells were re-suspended in PBS, 2% FBS fatty acid free and incubated with various concentration (0.1nM to 2mM) of S1P-fluorescein-conjugated (Echelon) for 20min or S1P-fluorescein-conjugated (Echelon) with 20 times more unconjugated S1P to measure the non-specific binding. Data acquisition was performed on FACSCanto II (BD) flow cytometer and analyzed with FlowJo software (Treestar). Specific mean fluorescence intensity was plotted against S1P concentration and Bmax was calculated from the scatchard plot generated on Graphpad Prism.

Data analysis and statistics

Where quantification is included for Western blots, signals were quantified by densitometric analysis using Image J. Data represented are the means \pm sem of a least three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software with either paired t test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test.

References

- 1 Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 283-296 (2012).
- 2 Leslie, N. R. & Foti, M. Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes. *Trends Pharmacol Sci* 32, 131-140 (2011).
- 3 Chalhoub, N. & Baker, S. J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 127-150 (2009).
- 4 Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355 (1998).
- 5 Alimonti, A. *et al.* Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* 42, 454-458 (2010).
- 6 Trotman, L. C. *et al.* Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* 1, E59 (2003).
- 7 Poliseno, L. *et al.* A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033-1038 (2010).
- 8 Tay, Y. *et al.* Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* 147, 344-357 (2011).
- 9 Kotelevets, L. *et al.* Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *Faseb J* 19, 115-117 (2005).
- 10 Takahashi, Y., Morales, F. C., Kreimann, E. L. & Georgescu, M. M. PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. *Embo J* 25, 910-920 (2006).
- 11 Lima-Fernandes, E. *et al.* Distinct functional outputs of PTEN signalling are controlled by dynamic association with beta-arrestins. *Embo J* 30, 2557-2568 (2011).
- 12 Wu, X. *et al.* Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 4233-4238 (2000).
- 13 Huang, J. *et al.* SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun* 3, 911 (2012).

- 14 Lee, J. O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 99, 323-334 (1999).
- 15 Torres, J. & Pulido, R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 993-998 (2001).
- 16 Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N. & Sellers, W. R. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20, 5010-5018 (2000).
- 17 Vazquez, F. *et al.* Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 276, 48627-48630 (2001).
- 18 Das, S., Dixon, J. E. & Cho, W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7491-7496 (2003).
- 19 Bolduc, D. *et al.* Phosphorylation-mediated PTEN conformational closure and deactivation revealed with protein semisynthesis. *Elife* 2, e00691 (2013).
- 20 Odriozola, L., Singh, G., Hoang, T. & Chan, A. M. Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem* 282, 23306-23315 (2007).
- 21 Rahdar, M. *et al.* A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 480-485 (2009).
- 22 Li, Z. *et al.* Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 7, 399-404 (2005).
- 23 Lu, Y. *et al.* Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem* 278, 40057-40066 (2003).
- 24 Koul, D. *et al.* Motif analysis of the tumor suppressor gene MMAC/PTEN identifies tyrosines critical for tumor suppression and lipid phosphatase activity. *Oncogene* 21, 2357-2364 (2002).
- 25 Silva, A. *et al.* PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest* 118, 3762-3774 (2008).
- 26 Lohse, M. J., Nuber, S. & Hoffmann, C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* 64, 299-336 (2012).

- 27 Charest, P. G., Terrillon, S. & Bouvier, M. Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO Rep* 6, 334-340 (2005).
- 28 Achour, L., Kamal, M., Jockers, R. & Marullo, S. Using quantitative BRET to assess G protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *Methods Mol Biol* 756, 183-200 (2011).
- 29 Daya-Makin, M. *et al.* Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 54, 2262-2268 (1994).
- 30 Landesman-Bollag, E. *et al.* Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 20, 3247-3257 (2001).
- 31 Scaglioni, P. P. *et al.* A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283 (2006).
- 32 Vemula, S., Shi, J., Hanneman, P., Wei, L. & Kapur, R. ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability. *Blood* 115, 1785-1796 (2010).
- 33 Sanchez, T. *et al.* PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4312-4317 (2005).
- 34 Barnes, W. G. *et al.* beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 coordinately activate RhoA and stress fiber formation following receptor stimulation. *J Biol Chem* 280, 8041-8050 (2005).
- 35 Anthony, D. F. *et al.* beta-Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation. *Mol Cell Biol* 31, 1066-1075 (2011).
- 36 Godin, C. M. & Ferguson, S. S. The angiotensin II type 1 receptor induces membrane blebbing by coupling to Rho A, Rho kinase, and myosin light chain kinase. *Mol Pharmacol* 77, 903-911 (2010).
- 37 Violin, J. D. *et al.* Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 572-579 (2010).

- 38 Chikumi, H., Vazquez-Prado, J., Servitja, J. M., Miyazaki, H. & Gutkind, J. S. Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem* 277, 27130-27134 (2002).
- 39 Wikstrom, K., Kavanagh, D. J., Reid, H. M. & Kinsella, B. T. Differential regulation of RhoA-mediated signaling by the TPalpha and TPbeta isoforms of the human thromboxane A2 receptor: independent modulation of TPalpha signaling by prostacyclin and nitric oxide. *Cell Signal* 20, 1497-1512 (2008).
- 40 Song, P. *et al.* Thromboxane A2 receptor activates a Rho-associated kinase/LKB1/PTEN pathway to attenuate endothelium insulin signaling. *J Biol Chem* 284, 17120-17128 (2009).
- 41 Ginestier, C. *et al.* ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene* 26, 7163-7169 (2007).
- 42 Nagata, Y. *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6 (2004).
- 43 Scaltriti, M. *et al.* Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99, 628-638 (2007).
- 44 Walker, S. M., Leslie, N. R., Perera, N. M., Batty, I. H. & Downes, C. P. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J* 379, 301-307 (2004).
- 45 Duerr, E. M. *et al.* PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16, 2259-2264 (1998).
- 46 Trotman, L. C. *et al.* Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141-156 (2007).
- 47 Chi, S. G. *et al.* Mutational abrogation of the PTEN/MMAC1 gene in gastrointestinal polyps in patients with Cowden disease. *Gastroenterology* 115, 1084-1089 (1998).
- 48 Boosani, C. S. & Agrawal, D. K. PTEN modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 23, 569-580 (2013).
- 49 Shi, Y., Paluch, B. E., Wang, X. & Jiang, X. PTEN at a glance. *J Cell Sci* 125, 4687-4692 (2012).

- 50 Malaney, P., Pathak, R. R., Xue, B., Uversky, V. N. & Dave, V. Intrinsic Disorder in PTEN and its Interactome Confers Structural Plasticity and Functional Versatility. *Sci Rep* 3, 2035 (2013).
- 51 Naguib, A. & Trotman, L. C. PTEN plasticity: how the taming of a lethal gene can go too far. *Trends Cell Biol* 23, 374-379 (2013).
- 52 Belsches-Jablonski, A. P. *et al.* Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene* 20, 1465-1475 (2001).
- 53 Turowec, J. P. *et al.* Protein kinase CK2 is a constitutively active enzyme that promotes cell survival: strategies to identify CK2 substrates and manipulate its activity in mammalian cells. *Methods Enzymol* 484, 471-493 (2010).
- 54 Storez, H. *et al.* Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J Biol Chem* 280, 40210-40215 (2005).
- 55 Scott, M. G. *et al.* Cooperative regulation of extracellular signal-regulated kinase activation and cell shape change by filamin A and beta-arrestins. *Mol Cell Biol* 26, 3432-3445 (2006).
- 56 Boularan, C. *et al.* beta-arrestin 2 oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18061-18066 (2007).

Acknowledgements

We thank Dr. M. Scaltriti for the MCF-7 HER2-expressing cell lines, Genentech for the gift of trastuzumab (Herceptin), and Drs. S. Bourdoulous, E. Chastre and L. Kotelevets for helpful discussion. J. Liotard, A. Thuret and O. Muntaner provided excellent technical assistance. We also thank the Institut Cochin Imaging and Sequencing platforms. The Receptor Signalling and Molecular Scaffolds laboratory at the Institut Cochin is part of the multi-disciplinary "Who am I?" LABEX. This work was funded by grants from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer ("Projet ARC" to MGHS), Ligue Contre le Cancer (comité de l'Oise to MGHS), Royal Society International Joint Project Scheme (to GB and MGHS), Fondation pour la Recherche Biomedicale ("Equipe FRM"), CNRS, INSERM and the Canadian Institute for Health Research. MB holds a Canada research Chair. ELF was funded by a doctoral fellowship from the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer and is currently funded by a post-doctoral fellowship from the National Research Fund Luxembourg, and co-funded under the Marie Curie Actions of the European Commission (FP7-COFUND). SMi is supported by a LABEX "Who am I?" doctoral fellowship.

Author contributions

ELF, SMi, CB, JSP and MGHS performed experiments. ELF, SMi, CB, JSP, MB, SM and MGHS designed research. ELF, SMi, CB, JSP, HE, PPR, MB, GSB, SM and MGHS analyzed data. ELF and MGHS wrote the manuscript, which was subsequently reviewed by all authors.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Figure Legends

Figure 1. The Rluc-PTEN-YFP biosensor retains PTEN functionality

(a) Schematic representation of Rluc-PTEN-YFP biosensor. PTEN is sandwiched between Rluc (Luc in diagram) and YFP. This diagram illustrates how conformational changes may induce variations in BRET measurements, although the real orientations of donor and acceptor proteins are not known. (b) PTEN immunoprecipitates from PC-3 cells expressing YFP or Rluc-PTEN-YFP, were analysed for the capacity to dephosphorylate water soluble diC8-PIP3 (100 μ M). Data shown represent mean \pm sem of three independent experiments. ** $p < 0.01$, t test. (c) Levels of activated Akt (pAkt Ser 473) measured in PC-3 cells reconstituted with Myc-PTEN, Rluc-PTEN-YFP or PTEN-YFP. Histogram represents quantification of relative pAkt levels for four independent experiments. A.U.: Arbitrary Units. *** $p < 0.001$, ANOVA with Bonferroni post hoc test. (d) Subcellular distribution of YFP, PTEN-YFP and Rluc-PTEN-YFP. HEK cells were transfected with the indicated plasmids and live cells were imaged. Scale bar is 10 μ m. (e) Coimmunoprecipitation of Rluc-PTEN-YFP with Myc- β -arr2 from transfected HEK293 cells. Myc- β -arr2 was immunoprecipitated using anti-myc antibodies and associated Rluc-PTEN-YFP was revealed with an anti-GFP antibody.

Figure 2. Intramolecular BRET signals of Rluc-PTEN-YFP

(a) mBRET measurements in HEK293 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP for intramolecular BRET, or cotransfected with Rluc-PTEN and PTEN-YFP for intermolecular BRET. PC-3 cells were transfected with Rluc-PTEN-YFP at levels comparable to endogenous PTEN in HEK cells as shown in Western blot (b). Data are mean \pm sem of four independent experiments. (c) BRET measurements for increasing concentrations of the indicated constructs. Data are mean \pm sem of four independent experiments. (d) representative blots using an anti-PTEN antibody. Symbols (*) and (+) refer to their respective BRET measurements in (c). BRET measurements in these experiments were performed on detached cells.

Figure 3. Conformational change of PTEN monitored by BRET following mutation of key regulatory residues

(a) Schematic representation of PTEN showing the regulatory phosphorylation site residues in the C-terminal tail and the mutation introduced to create the PTEN-A4 mutant. Respective mBRET (b) Δ mBRET (c) and % Δ mBRET (d) values of Rluc-PTEN^{wt}-YFP and Rluc-PTEN(A4)-YFP. The graphs represent mean \pm sem of four independent experiments. *** $p < 0.001$, t test. (e) Localisation of PTEN constructs in HEK cells. Cells were transfected with Rluc-PTEN^{wt}-YFP and Rluc-PTEN(A4)-YFP, and live cells were imaged. Insets show magnified regions of the boxed areas and demonstrate membrane targeting of PTEN-A4 (arrowheads). (f) % Δ mBRET of Rluc-PTEN(A4)-YFP versus Rluc-PTEN^{wt}-YFP in HeLa cells. Error bars are sem. (g and h) Colocalization of Rluc-PTEN-YFP and Rluc-PTEN(A4)-YFP with fluorescent-WGA on non-permeabilized HeLa cells. Insets show magnified regions of the boxed regions. Scale bars are 10 μ m. Quantification mean \pm sem on 12 different cells was performed using the Image J colocalization plugin, *** $p < 0.001$, t test. BRET measurements in these experiments were performed on detached cells.

Figure 4. Modulation of CK2 promotes conformational changes in PTEN

(a-c) Effect of overnight incubation with the CK2 inhibitor, TBB (50 μ M), on BRET signal (a) and phosphorylation of the S380/T382/T383 cluster (b and c) in PC-3 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP. The graphs represent mean \pm sem of four independent experiments. A.U.: Arbitrary Units. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, t tests. (d and e) Effect of TBB incubation on pAKT levels in serum starved PC-3 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP. The graph represents mean \pm sem of four independent experiments. A.U.: Arbitrary Units. ** $p < 0.01$, t test. (f) Effect of overexpression of HA-CK2 on BRET of Rluc-PTEN-YFP in HEK cells. The graph represents mean \pm sem of four independent experiments. *** $p < 0.001$, t test. BRET measurements in these experiments were performed on detached cells.

Figure 5. Conformational changes of Rluc-PTEN-YFP induced by active RhoA and β -arr2 are associated with its activation status

(a) Δ mBRET values for Rluc-PTEN-YFP in HEK cells cotransfected with either empty vector or Myc-RhoV14. Graph represents means for five independent experiments \pm sem. *** $p < 0.001$, t test. (b) *In vitro* lipid phosphatase activity of immunoprecipitated PTEN biosensor, using an anti-GFP antibody, from HEK293 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP, or Rluc-PTEN-YFP

and Myc-RhoV14. YFP vector control values were subtracted and samples normalized to PTEN alone. Data shown represents mean \pm sem of three independent experiments. ** $p < 0.01$, t test. (c) Serum starved HEK cells transfected with empty vector or Myc-RhoV14 were assessed for pAKT levels. Data shown represents mean \pm sem of six independent experiments. A.U.: Arbitrary Units. *** $p < 0.001$, t test. (d) Δ mBRET values for Rluc-PTEN-YFP in HEK cells cotransfected with either empty vector or FLAG- β -arr2. Graph represents means for five independent experiments \pm sem. ** $p < 0.01$, t test. (e) *In vitro* lipid phosphatase activity of immunoprecipitated PTEN, using an anti-GFP antibody, from HEK293 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP, or Rluc-PTEN-YFP and FLAG- β -arr2. YFP vector control values were subtracted and samples normalized to PTEN alone. Data shown represents mean \pm sem of three independent experiments. ** $p < 0.01$, t test. (f) Δ mBRET values for Rluc-PTEN-YFP in WT or β -arr2^{-/-} MEFs transfected with Rluc-PTEN-YFP. Graph represents means for four independent experiments \pm sem. ** $p < 0.01$, t test. (g) WT and β -arr2^{-/-} MEFs were assessed for pAKT levels. Data shown represents mean \pm sem of four independent experiments. A.U.: Arbitrary Units. * $p < 0.05$, t test. BRET measurements in these experiments were performed on detached cells.

Figure 6. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1PR2)-induced PTEN conformational rearrangement monitored by real-time BRET

HEK (a) or HeLa cells (b) were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and S1PR1 or S1PR2, and treated with S1P (100 nM) or vehicle (PBS). Graphs represent Δ mBRET measurements at $t = 5$ min as mean \pm sem for four independent experiments. ** $p < 0.01$, t test, n.s. means not significant. (c) HeLa cells were preincubated with the S1PR2-specific antagonist JTE103 (1 μ M) and then treated with S1P for 5 min. Cells were lysed and assessed for active AKT (pAKT) levels. BRET measurements in these experiments were performed on adherent cells.

Figure 7. Angiotensin Type 1A receptor (AT1AR)-induced PTEN activation monitored by real-time BRET

(a) ROCK activity was assessed, after AngII treatment, by immunoprecipitation of ROCK followed by incubation with its substrate, MYPT. Levels of activated MYPT (pMYPT) were revealed by Western Blot. (b) HEK cells were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and AT1AR and treated with AngII (100 nM). Graph represents the means \pm sem of three independent

experiments. *** $p < 0.001$, t tests. (c) PTEN lipid phosphatase activity measured *in vitro* following AngII (100nM) stimulation in HEK cells cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and AT1AR. Rluc-PTEN-YFP was immunoprecipitated using an anti GFP antibody and incubated with water soluble diC8-PIP3 (100 μ M). YFP vector control values were subtracted and samples normalized to PTEN alone. Graph represents the means \pm sem of three independent experiments. *** $p < 0.001$, ANOVA with Bonferroni post hoc test. (d) HeLa cells were cotransfected with AT1AR and control or PTEN-targeting siRNA. Cells were left unstimulated or stimulated with AngII (100nM) before being lysed and assessed for pAKT and PTEN levels by Western blot. (e) Real-time experiment curves of ligand-induced conformational changes. HEK cells were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and AT1AR and treated with AngII (100 nM). BRET readings were collected immediately after addition of agonist. Graph represents the means \pm sem of five independent experiments. (f) HEK cells were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and AT1AR and treated with increasing concentrations of AngII (0.01nM-10 μ M) for 10min. Data were plotted using non-linear regression (Prism). Graph represents the means \pm sem of five independent experiments. (g) HEK cells were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and AT1AR. Cells were pre-treated with ROCK inhibitor Y27632 (10 μ M) for 3 hours prior to AngII stimulation. In the kinetic cells are normalized to control cells at time 0. Data represent the means \pm sem of five independent experiments. (h) Histogram representation of data in (g) at 0, 5 and 20 mins showing Δ mBRET normalized to control cells at $t=0$ min. (i) HeLa cells were transfected with AT1AR and pre-treated with ROCK inhibitor Y27632 (10 μ M) for 3 hours prior to AngII stimulation. Cells were subsequently lysed and assessed for pAKT (Thr 308 and Ser 473 sites) levels by Western blot. Quantification of four independent experiments for phosphorylation of AKT at Thr308 and Ser473 is shown in panels (j) and (k). A.U.: Arbitrary Units. Error bars are sem. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ANOVA with Bonferroni post hoc test. BRET measurements in these experiments were performed on adherent cells.

Figure 8. Thromboxane A2 receptor (TP α R) and muscarinic M1 receptor (M1MR)-induced PTEN activation monitored by real-time BRET

(a) and (b) HEK cells were cotransfected with Rluc-PTEN-YFP and TP α R or M1MR, and treated with thromboxane mimetic U46619 (1 μ M) or Carbachol (CCh) (100 μ M). Graphs represent the means \pm sem of three independent experiments. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, t tests. (c)

and **(d)** HeLa cells were cotransfected with TP α R or M1MR and control or PTEN-targeting siRNA. Cells were left unstimulated or stimulated with U46619 (1 μ M) or Carbachol (CCh) (100 μ M) before being lysed and assessed for pAKT and PTEN levels by Western blot. BRET measurements in these experiments were performed on adherent cells.

Figure 9. Trastuzumab induces conformational changes that correlate with enhanced lipid phosphatase activity of PTEN

(a) BRET experiment in SKBR3 and MCF-7 cells transfected with Rluc-PTEN-YFP and treated with trastuzumab (2 μ g ml⁻¹) for the indicated times. Graph represents means \pm sem for four independent experiments. Lower panel shows representative Western Blot using an anti-ErbB2 antibody on lysates of SKBR3 and MCF-7 cells. GAPDH was used as loading control. **(b)** *In vitro* phosphatase assay of immunoprecipitated Rluc-PTEN-YFP from transfected SKBR3 treated with Trastuzumab for 20 minutes (2 μ g ml⁻¹). YFP vector control values were subtracted and samples normalized to PTEN alone. Graph represents the mean \pm sem of three independent experiments *** p<0.001, t test. **(c)** Levels of activated Akt (pAkt) assessed in SKBR3 cells. Cells were transfected with Rluc-PTEN-YFP and treated with Trastuzumab (2 μ g ml⁻¹). A.U.: Arbitrary Units. Graph represents the mean \pm sem of four independent experiments * p<0.05, t test. **(d)** MCF-7 cells stably transfected with ErbB2 or the truncated ErbB2 p95 variant were transiently transfected with Rluc-PTEN-YFP and treated with trastuzumab (2 μ g ml⁻¹) for the indicated times. Graph represents means \pm sem for four independent experiments, * p<0.05, t test. Lower panel shows representative Western Blot using an anti-ErbB2 antibody on lysates. Tubulin was used as loading control. BRET measurements in these experiments were performed on adherent cells.

Supplementary Figure 1. Fusion context of PTEN does not alter raw Rluc or YFP emissions

Raw Rluc (a) and laser excited YFP (b) counts are shown for cells transfected with Rluc-PTEN, Rluc-PTEN-YFP and Rluc-PTEN + PTEN-YFP from Figure 2a. YFP measurements were performed in black optiplates using 485nm excitation and 535nm emission. (c) Percentage of PC-3 cells grown in IBIDI μ -Slide 4-well dishes expressing biosensor following transfection with equivalent DNA amount of Rluc-PTEN-YFP as in Figure 2b. The cells were counter-

stained with DAPI and over 90 images (≈ 900 cells) from 4 different experiments were taken with a 63X objective on a wide-field microscope (Leica DMI6000). 34.0 \pm 3.1% cells were found to be transfected (GFP/DAPI signal). Four representative images are shown.

Supplementary Figure 2. C-terminal phosphorylation sites control association of the C-tail with catalytic and C2 domains of PTEN

(a) Schematic representation of PTEN- Δ tail and the tail-YFP constructs showing the regulatory phosphorylation site residues in the C-terminal tail and the mutation introduced to create the A4-tail mutant. **(b)** HEK cells were cotransfected with Myc-PTEN Δ tail and either WT-tail-YFP or A4-tail-YFP with the phosphorylation cluster residues mutated to alanine. Following cell lysis, immunoprecipitation was performed using an anti-myc antibody and the coimmunoprecipitated tail-YFP was detected using an anti-GFP antibody. **(c)** Immunoprecipitation of WT-tail-YFP with full length Myc-PTEN wt or A4.

Supplementary Figure 3. S1PR1 and S1PR2 are expressed at similar levels at the cell surface.

HeLa cells were re-suspended in PBS, 2% FBS fatty acid free and incubated with various concentration (0.1nM to 2mM) of S1P-fluorescein-conjugated (Echelon) for 20min or S1P-fluorescein-conjugated (Echelon) with 20 times more unconjugated S1P to measure the non specific binding. Specific mean fluorescence intensity was plotted against S1P concentration and Bmax was calculated from the scatchard plot generated on Graphpad Prism.

Supplementary Figure 4. Receptor stimulation does not affect raw Rluc or YFP emissions of Rluc-PTEN-YFP

Raw Rluc **(a)** and laser excited YFP emissions **(b)** in vehicle or AngII stimulated HEK cells transfected with AT1AR and Rluc-PTEN-YFP. Total fluorescence and bioluminescence were evaluated using a FlexStation II microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and Mithras LB 940, respectively. The YFP fluorescence was excited at 485 nm and read at 538 nm using a monochromator. Fluorescence values were corrected by subtracting the autofluorescence of cells not expressing YFP. Bioluminescence was evaluated after the addition

of 5 μ M coel-h and using a 480 ± 20 nm filter. The graphs represent mean \pm sem of four independent experiments. NS, non-significant.

Supplementary Figure 5. Cancer related mutations in unstructured regions of PTEN that ablate major mono-ubiquitination sites cause conformational change of PTEN

(a) Sequence of the N-terminal and C2 loop unstructured regions with K13 and K289 residues shown in blue and red respectively on the PTEN schematic and indicated on the PTEN structure (b). The structure (pdb15DR) was displayed using Visual Molecular Dynamics cartoon display. Residues 1-13 and 282-312 are not in the crystal and were added to the illustration. (c) HEK cells transfected with the mono-ubiquitination K13E/K289E display a change in BRET levels indicating conformational change.

Supplementary Figure 6. Representative uncropped blots

Shown are uncropped blots for the antibodies used in the study. The antibody used and the Figure to which it corresponds are indicated at the bottom of each blot.

Supplementary Table 1. Phosphate released from PIP3 in PTEN phosphatase assays

Shown are data of nmol phosphate released from 100μ M water soluble PI(3,4,5)P3 in the phosphatase assays from Angiotensin II- **(a)** and Trastuzumab- **(b)** induced PTEN activity, including vector transfected control samples from Figures 7c and 9b.

Figure 1

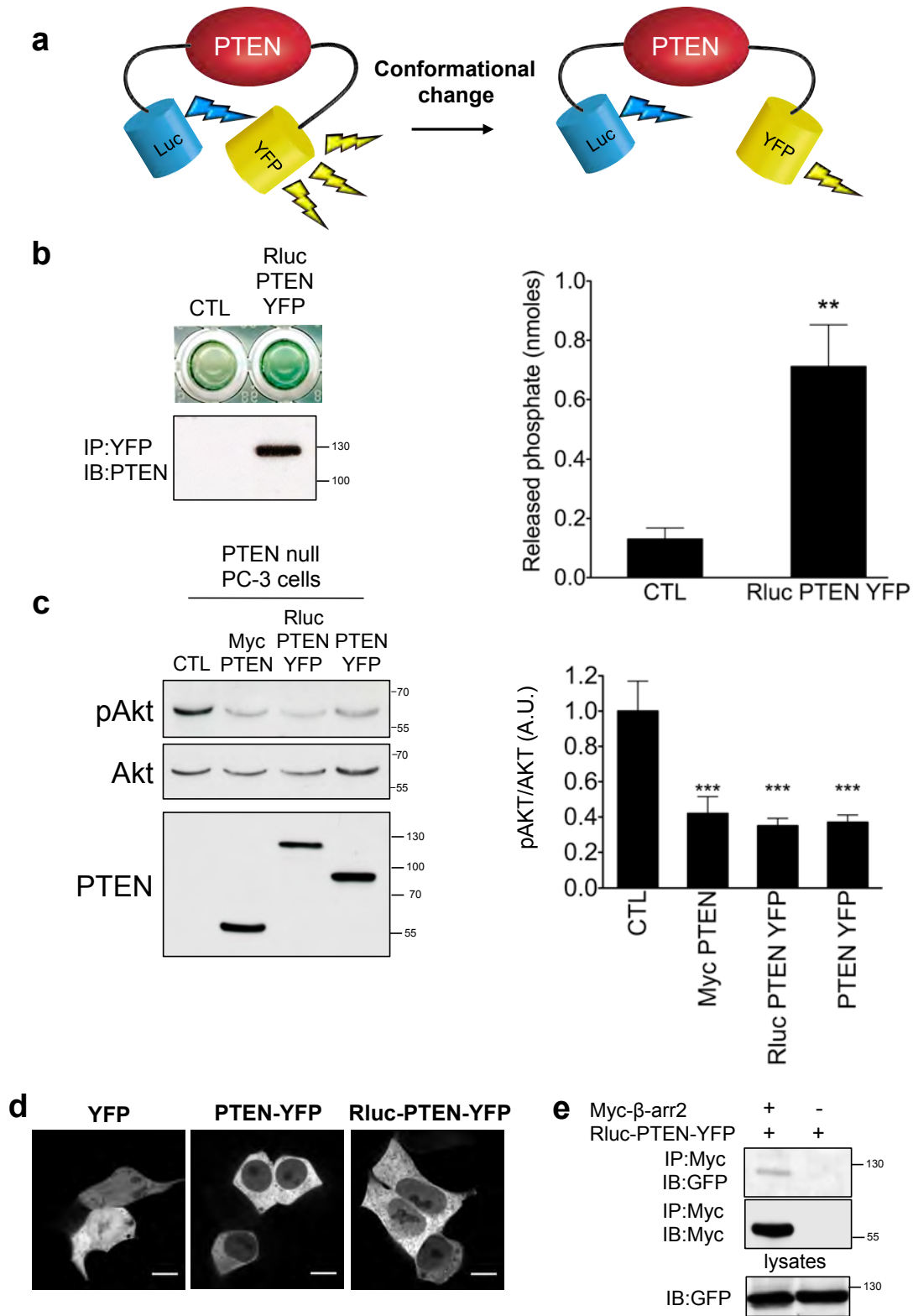


Figure 2

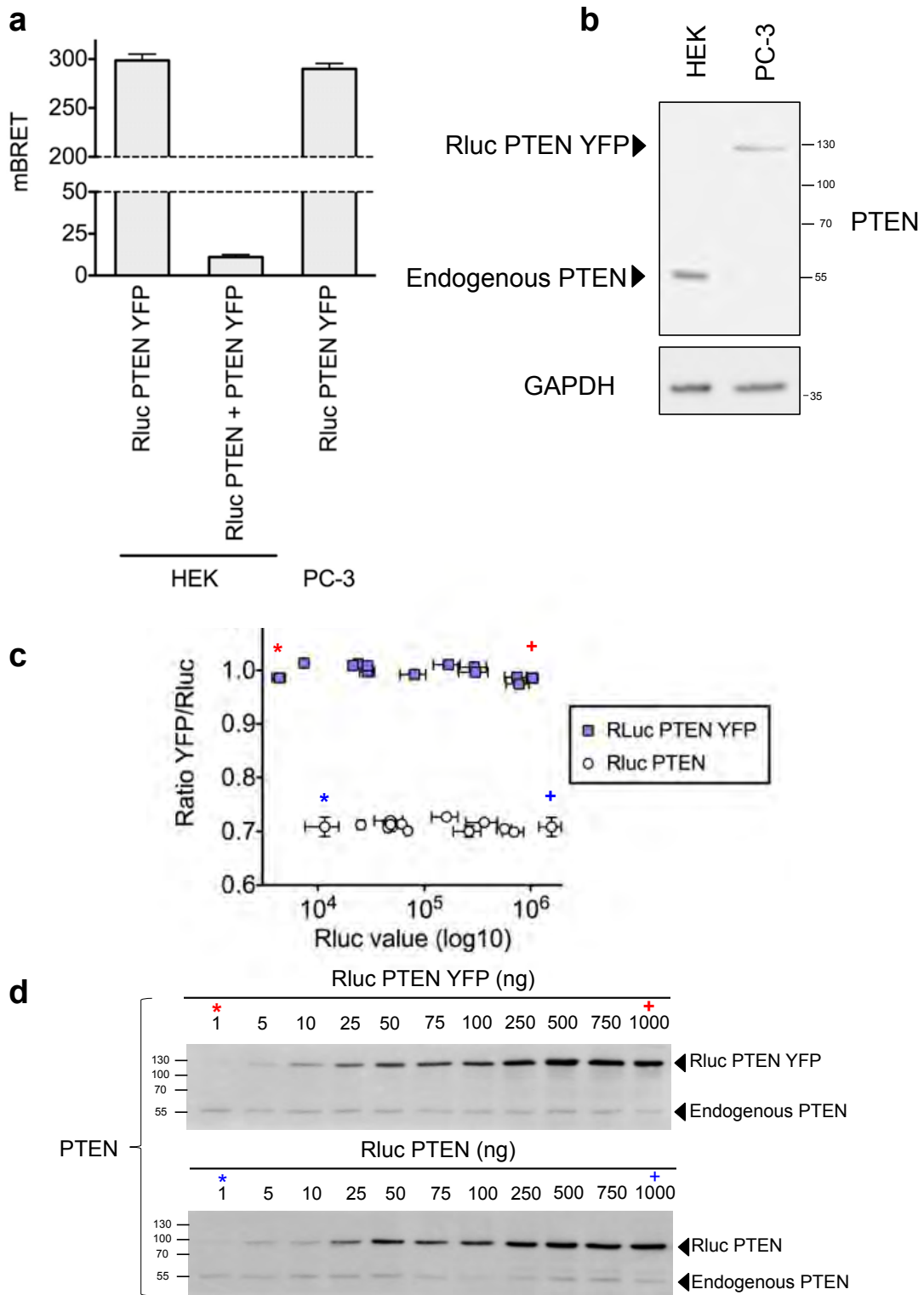


Figure 3

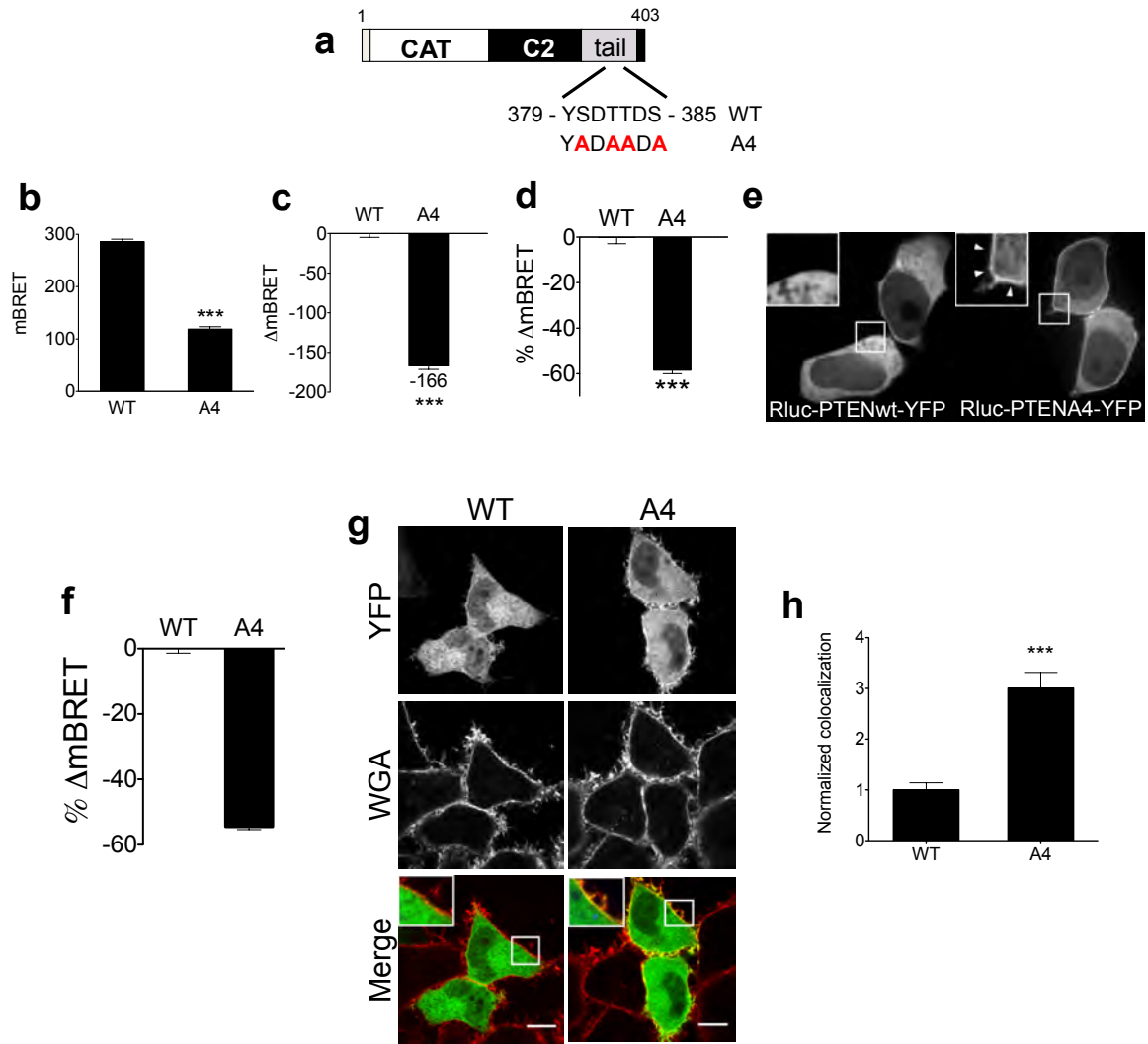


Figure 4

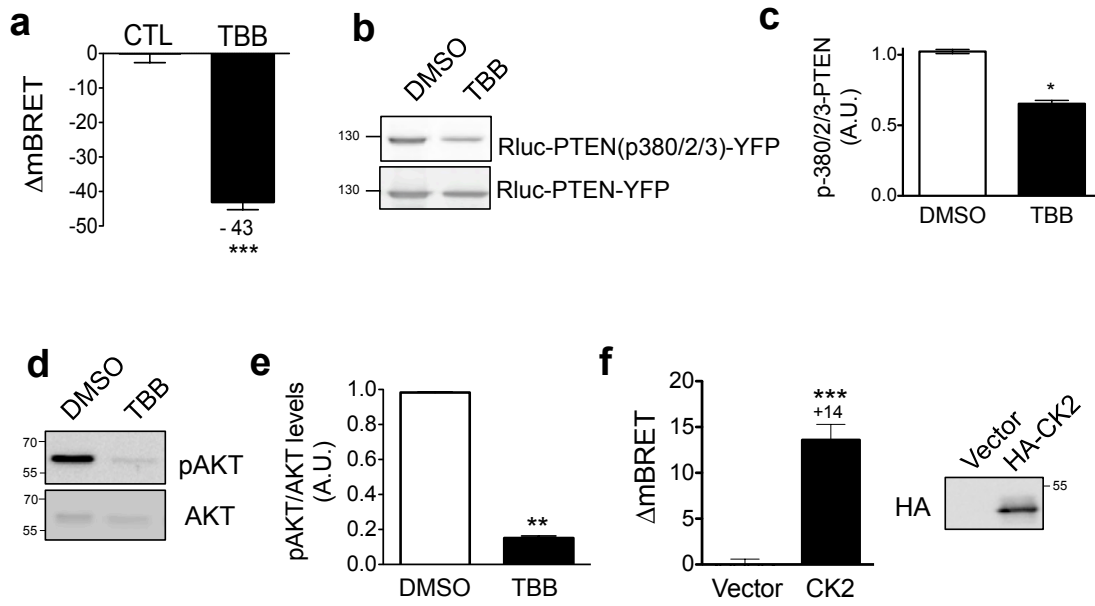


Figure 5

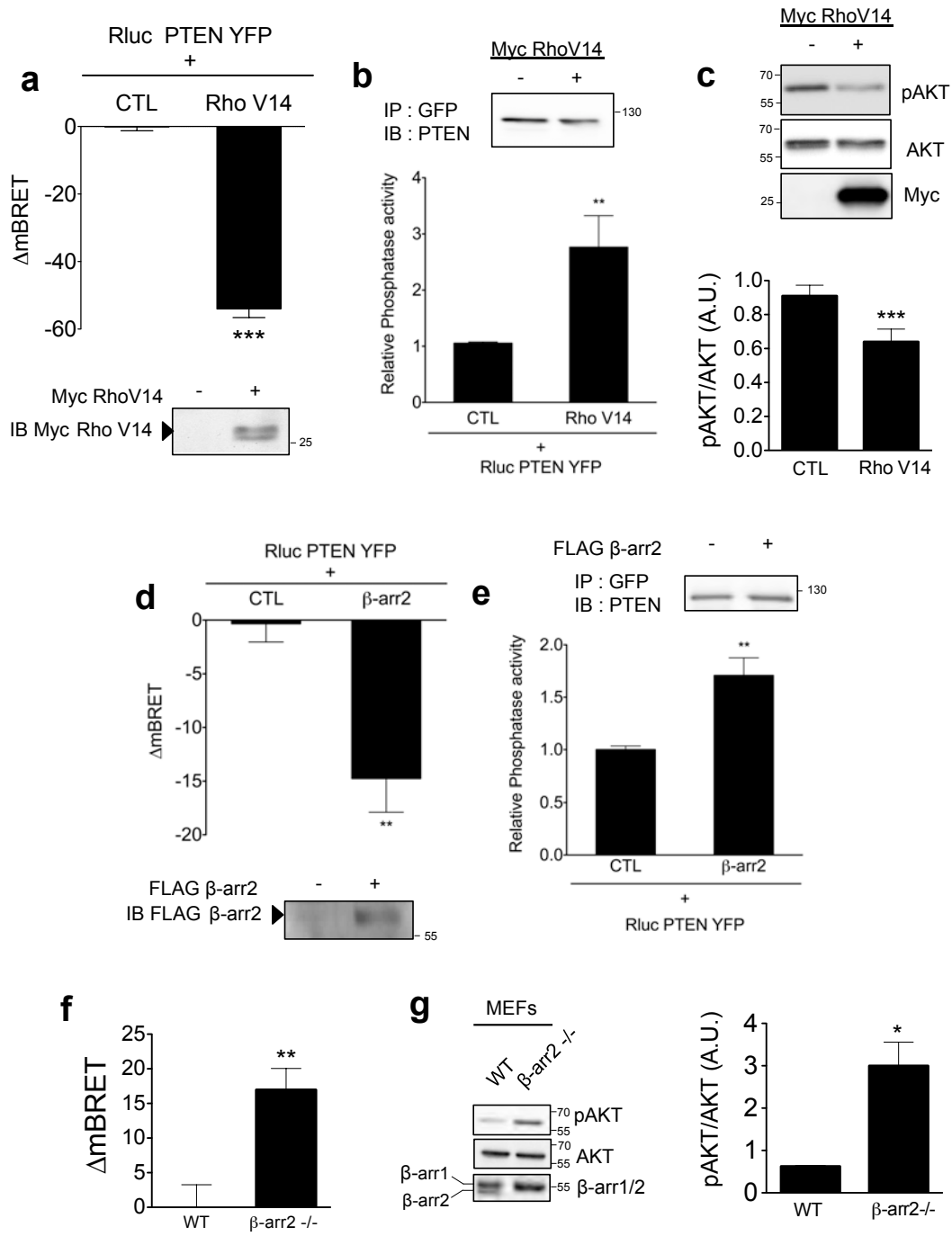


Figure 6

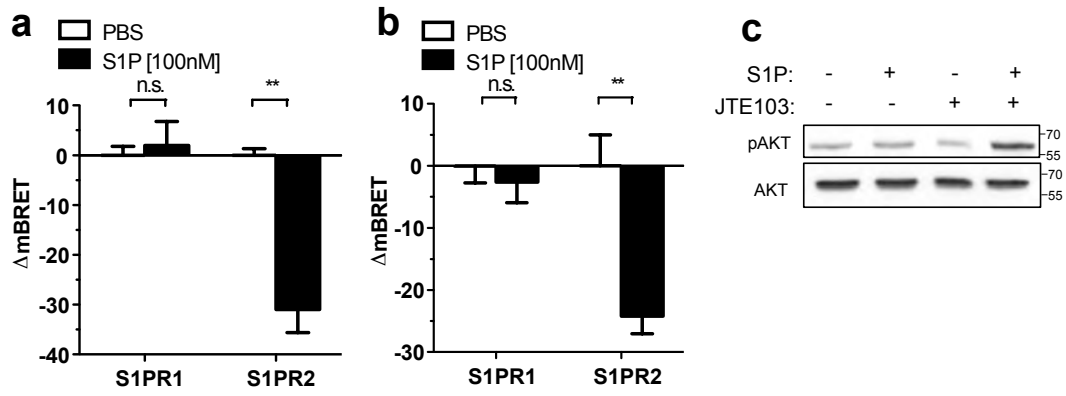


Figure 7

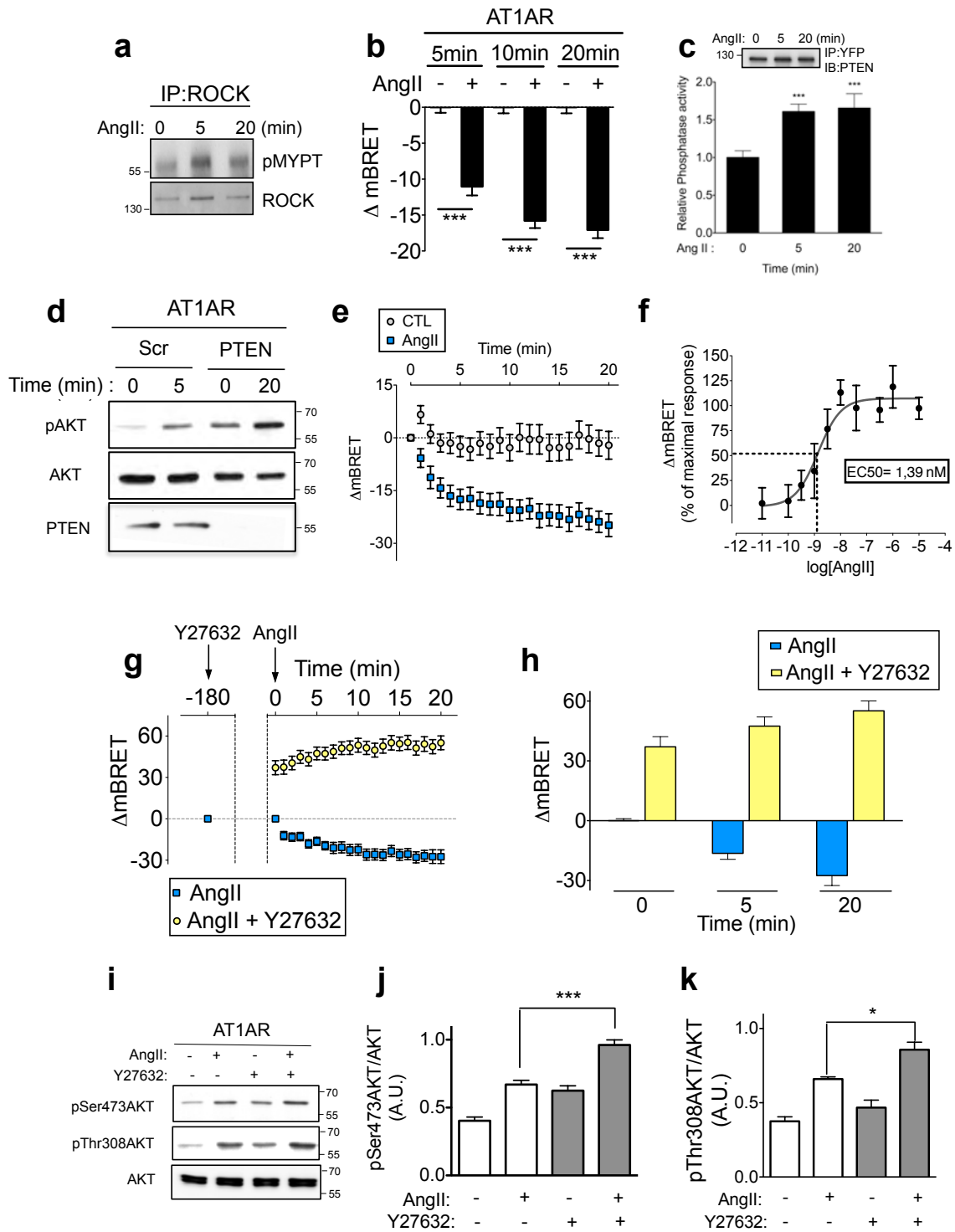


Figure 8

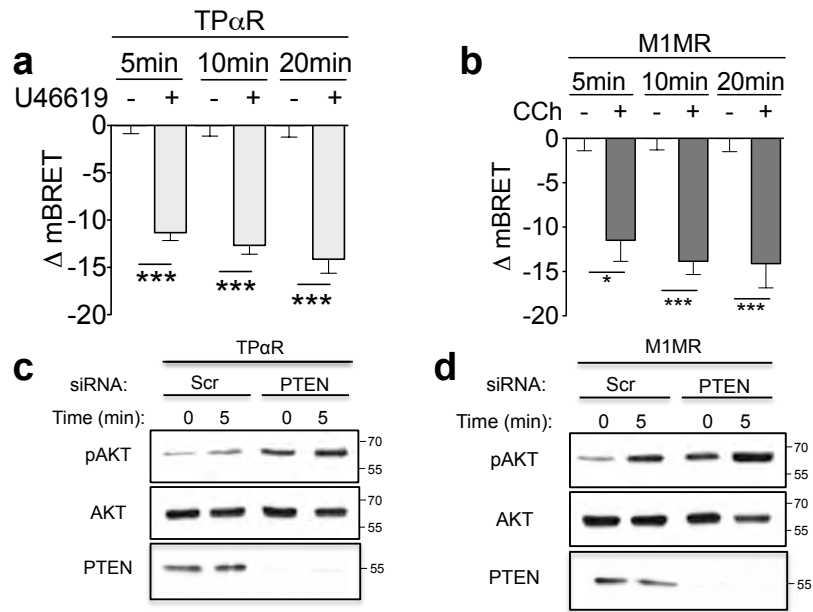
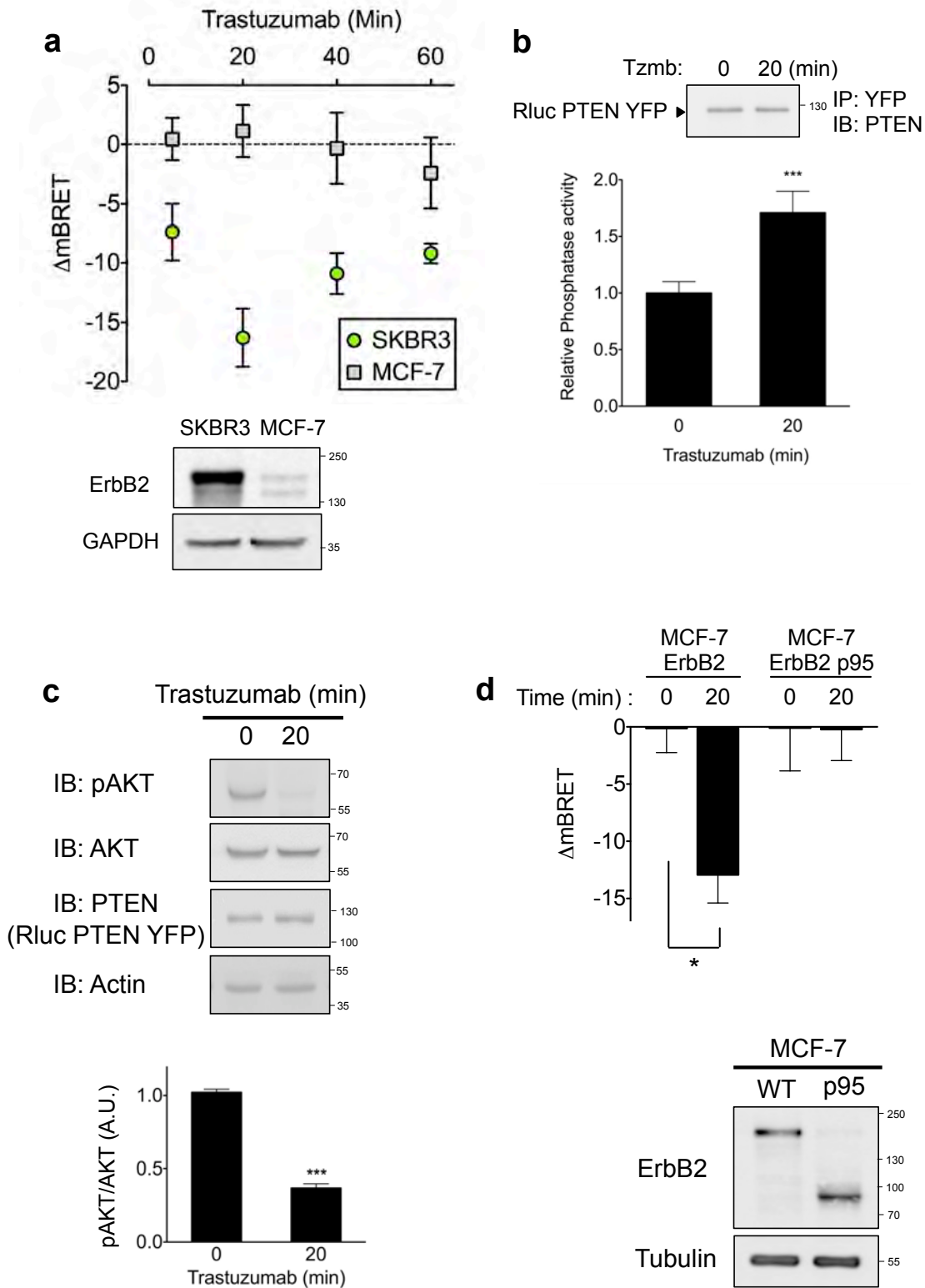
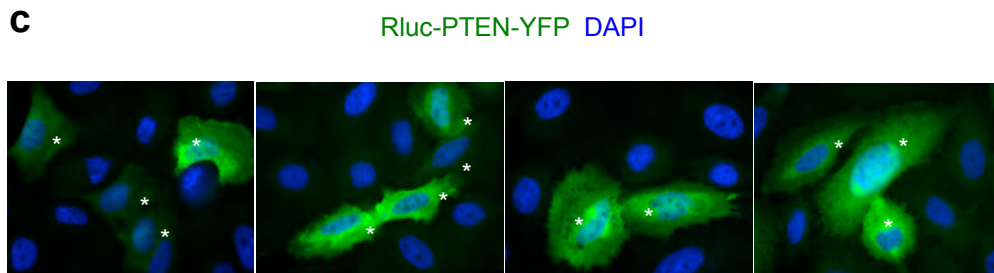
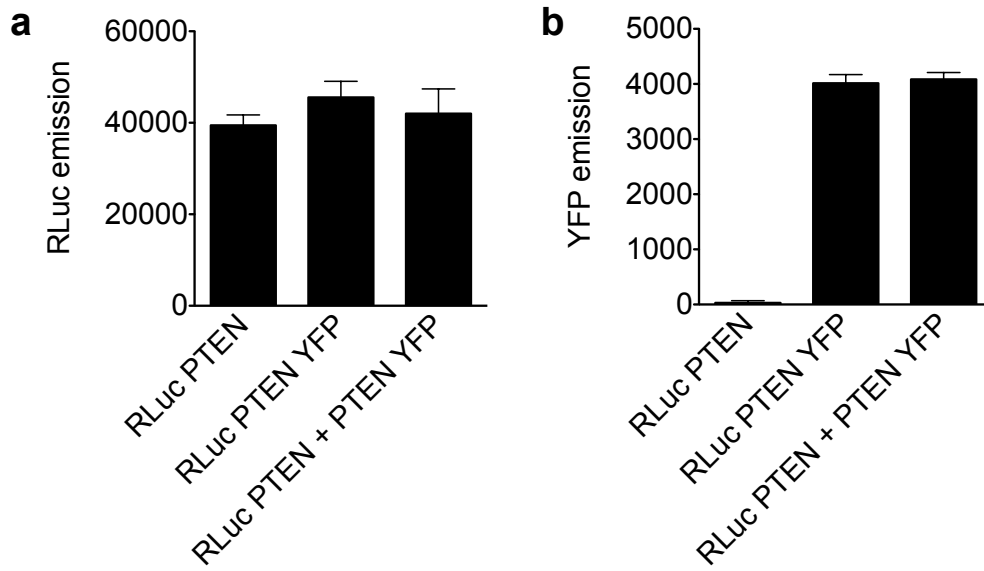


Figure 9

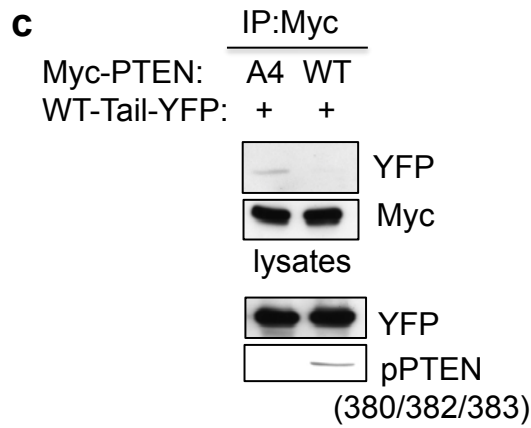
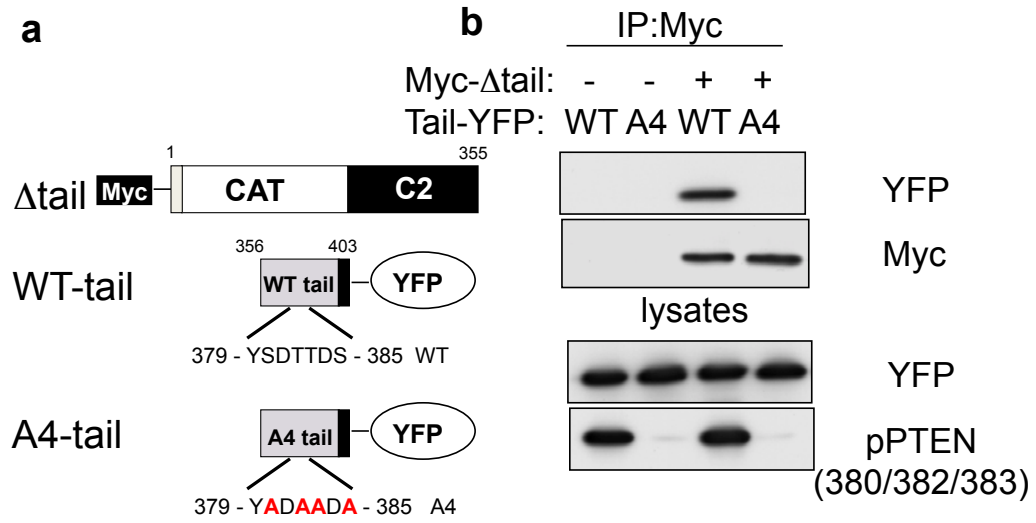


Supplementary Figure 1

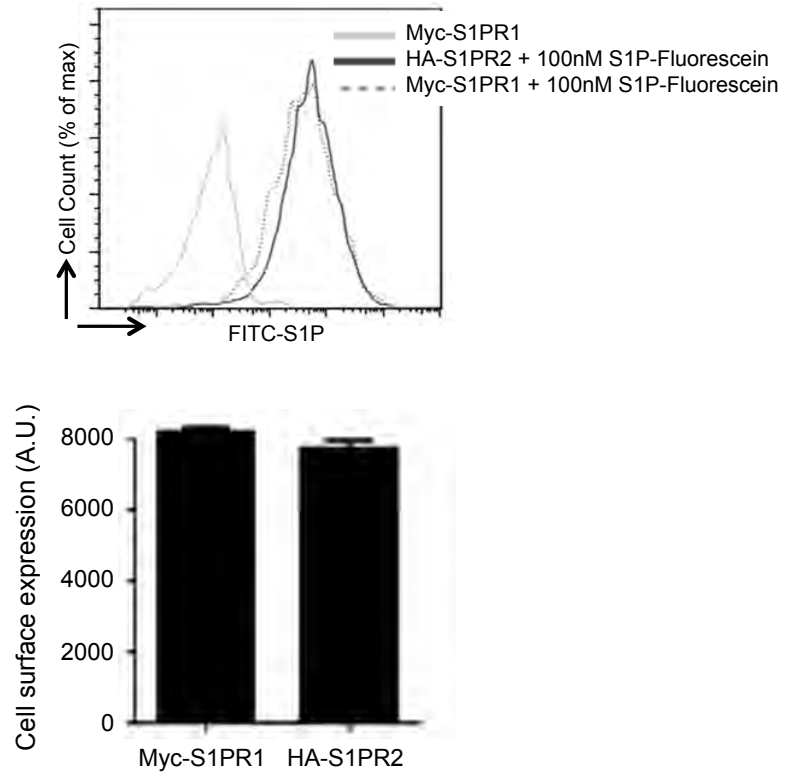


34 +/- 3.1 % cells transfected (n=4, 907 cells total)

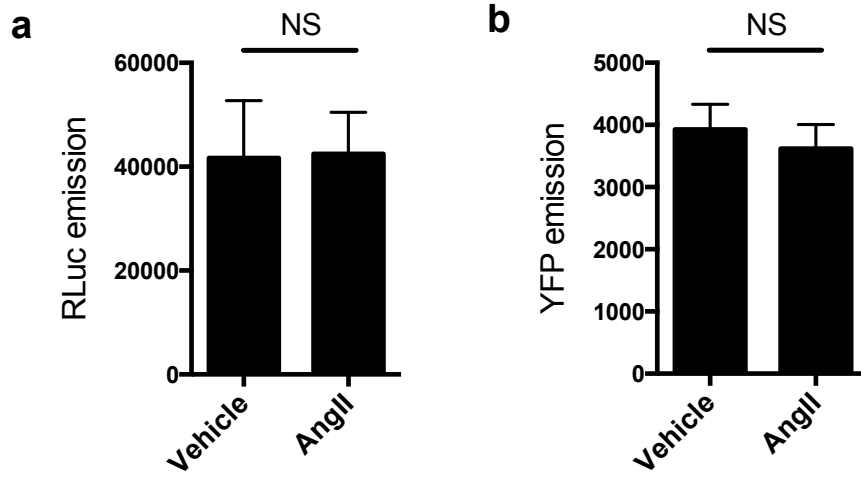
Supplementary Figure 2



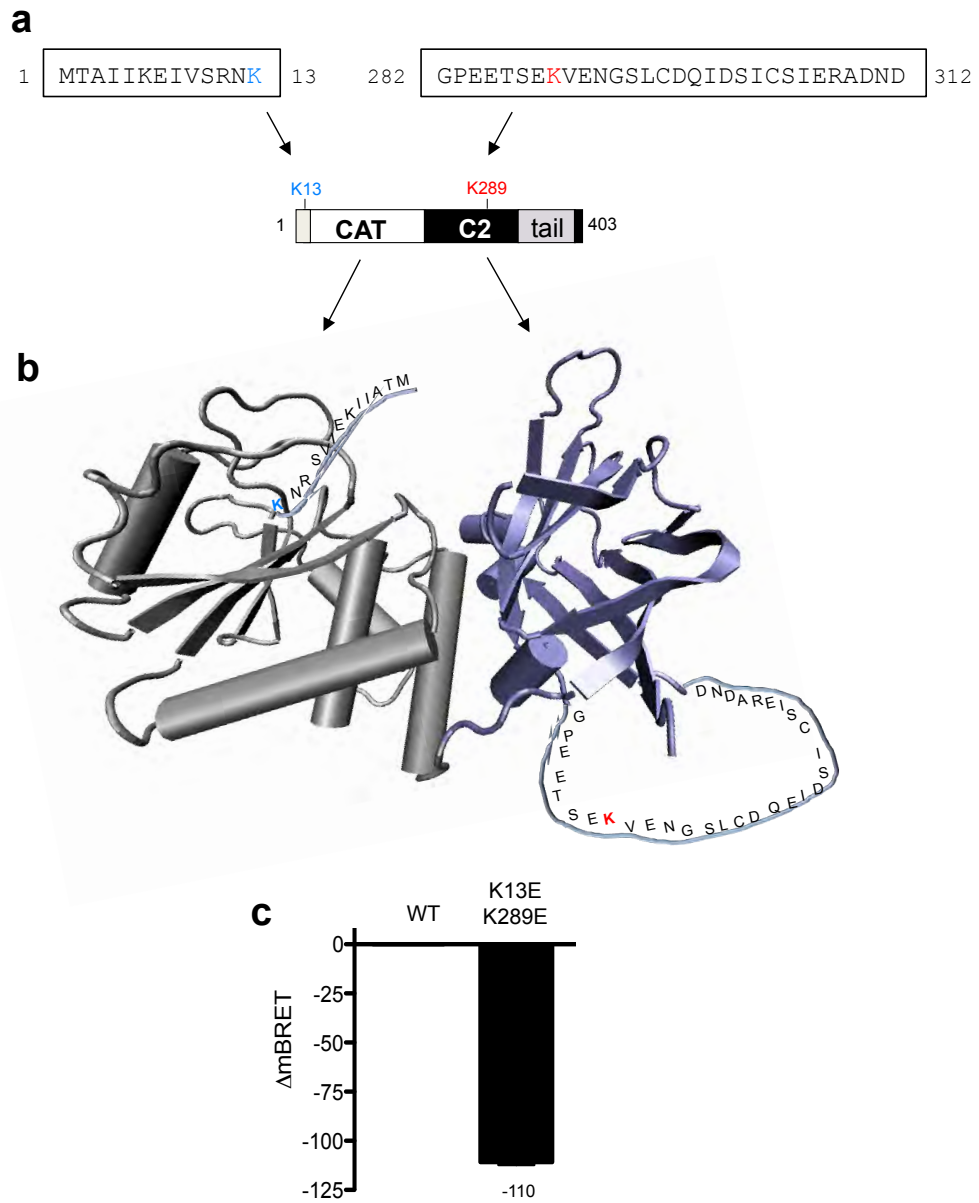
Supplementary Figure 3



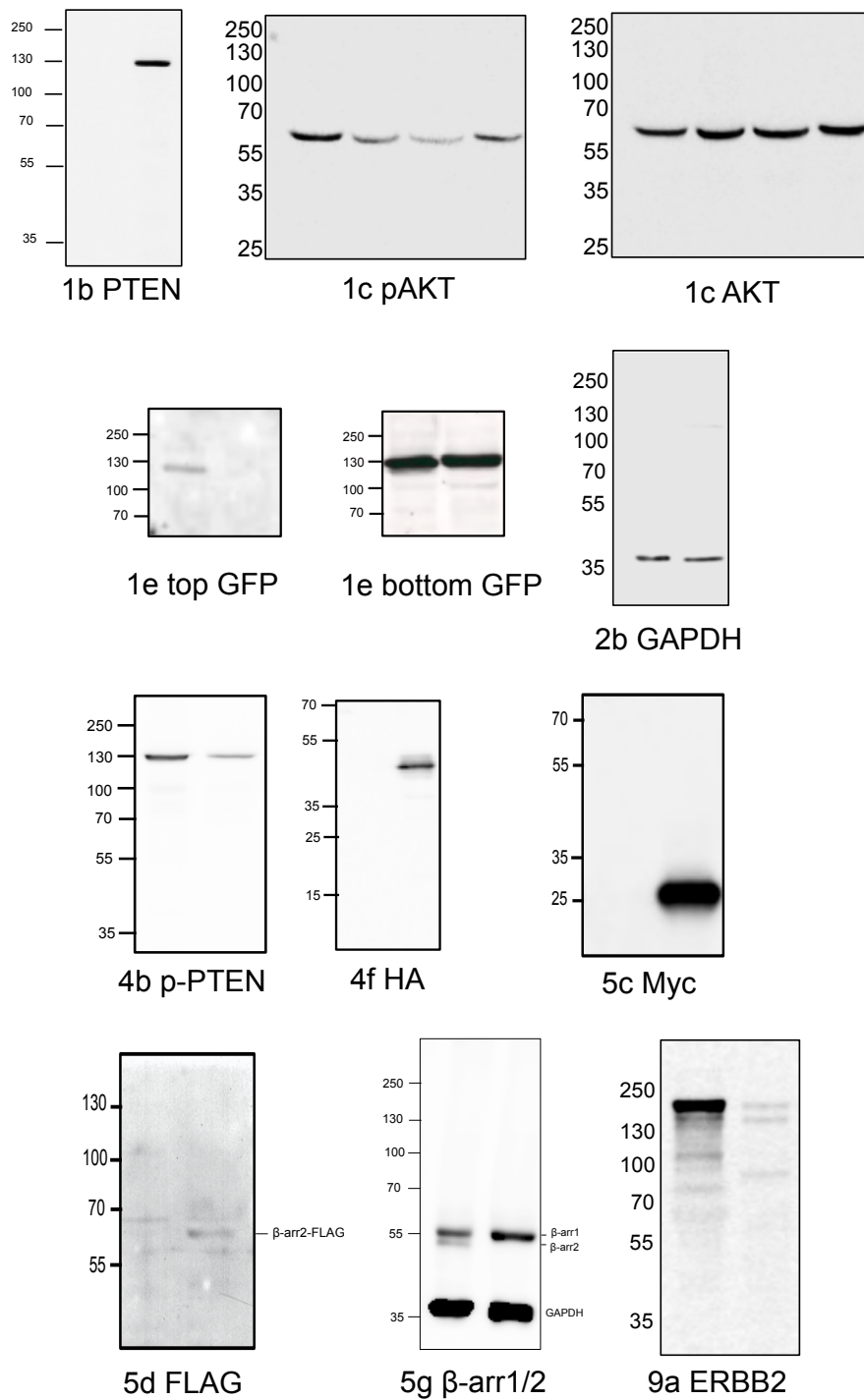
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Supplementary Table 1

a

		AngII (min) :		
		0	5	20
PTEN :	-	+	+	+
Phosphate (nmoles) :	0.100 +/- 0.07	0.264 +/- 0.041	0.358 +/- 0.047	0.365 +/- 0.063

b

Trastuzumab :	-	-	+
PTEN :	-	+	+
Phosphate (nmoles) :	0.109 +/- 0.005	0.215 +/- 0.052	0.296 +/- 0.066

Discussion

1. Discussion générale

Ces dernières années, notre vision de la signalisation des RCPG et de leur régulation par les arrestines a été profondément remodelée. La première grande révolution fut la redéfinition de la fonction de la protéine arrestine. Celle-ci, considérée d'abord comme un simple régulateur négatif de la signalisation via les protéines G, a été redéfinie comme une plateforme d'activation pour de nombreuses voies de signalisation, en plus d'être un régulateur clé du trafic des RCPG. Ces travaux ont ouvert la voie à tout un nouveau pan de la recherche sur les RCPG : la signalisation intracellulaire. La deuxième révolution fut une remise en question d'une vision compartimentée de la signalisation des protéines G. Jusqu'à récemment, il était admis que seules les arrestines participaient à la signalisation endosomale du récepteur internalisé, la signalisation des protéines G émanant uniquement de la membrane plasmique. Les activations des protéines G et des arrestines étaient aussi considérées comme des événements mutuellement exclusifs puisque le recrutement d'arrestine est responsable du désengagement des protéines G et du récepteur. Or, les travaux de ces dernières années ont permis de démontrer la coexistence des arrestines et des protéines G au sein d'un super-complexe avec le récepteur internalisé, qui permet le maintien d'une signalisation endosomale des protéines G. Cette découverte apporte un niveau de complexité supplémentaire à la signalisation par les RCPG et soulève de nombreuses questions quant à l'universalité et la modulation de ces voies de signalisation non-canoniques.

Comme à chaque fois, ces avancées ont été permises grâce au développement constant de nouvelles technologies permettant d'analyser avec finesse les subtilités de la signalisation cellulaire. Dans le domaine des RCPG, de nombreux biosenseurs de conformation et d'activation permettent de suivre avec précision diverses voies de signalisation. Par ailleurs, les progrès incessants dans le domaine de la microscopie cryo-électronique, de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) et de la cristallographie donnent accès à des informations précieuses sur la formation de complexes moléculaires et sur les interactions intra-

et intermoléculaires au sein de ceux-ci. Enfin, les outils pharmacologiques de plus en plus nombreux et de plus en plus spécifiques, tels que les inhibiteurs ou encore les ligands biaisés, permettent de moduler de manière spécifique une ou plusieurs voies en aval d'un RCPG, et constituent là aussi des outils précieux dans notre compréhension de mécanismes moléculaires régissant la signalisation de ces récepteurs.

2. Régulation du trafic des RCPG par ERK1/2

À la suite de la stimulation d'un RCPG par son agoniste, plusieurs voies de signalisation sont activées. Quelques-uns de ces effecteurs exercent une rétroaction sur les récepteurs et permettent de moduler leur activité. Les kinases GRK illustrent parfaitement ce phénomène. Ces kinases sont activées suite à la stimulation du récepteur et phosphorylent ce dernier, ce qui enclenche un processus de désensibilisation homologue. Quant aux kinases PKA et PKC, activées en aval des RCPG elles phosphorylent indifféremment les récepteurs liés ou non à leurs agonistes, ce qui enclenche un processus de désensibilisation hétérologue moins sélectif.

La voie ERK/MAPK est une des voies de signalisation majeures en aval des RCPG et peut être activée via des mécanismes variés, dépendant soit des protéines G soit des arrestines. Dans notre étude, présentée dans l'article 1, nous avons étudié le rôle de la kinase ERK dans la régulation des RCPG.

2.1. Modèle

Nos travaux mettent à jour un nouveau mécanisme d'internalisation des RCPG induit par la phosphorylation de β -arrestine1/2 par ERK1/2 sur les résidus Ser14 et Thr276, et ceci indépendamment d'une stimulation du récepteur par un agoniste. Cette régulation est observée uniquement parmi les récepteurs capables de recruter arrestine, ce qui représente la grande majorité des RCPG. Selon notre modèle, cette redistribution intracellulaire des récepteurs est observée en réponse à l'activation de ERK1/2 par l'une des voies suivantes : l'activation d'un récepteur membranaire (RTK ou RCPG), une mutation activatrice d'un des composants de voie Ras/MAPK ou encore un activateur mitogénique de cette voie. Ce mécanisme conduit à une

baisse globale de la réponse cellulaire à la stimulation des RCPG : diminution de l'activation des protéines G et de la production de messagers secondaires, ainsi que du recrutement de GRK et d'arrestine au récepteur. Cela constitue une boucle de régulation négative de la voie ERK/MAPK, similaire à un processus de désensibilisation hétérologue ; et considérant que la plupart des RCPG activent ERK1/2 après stimulation par l'agoniste cela participe aussi certainement à la désensibilisation homologue, même si cela n'a pas pu être directement démontré [Figure 19].

2.2. Caractérisation du mécanisme cellulaire

Le mécanisme moléculaire sous-jacent à la redistribution subcellulaire des RCPG par ERK n'a pas été pleinement élucidé. Nous avons démontré la séquestration des RCPG au sein de vésicules intracellulaires suite à l'activation de la voie Ras/MAPK, et il serait intéressant d'identifier ces vésicules. D'un point de vue théorique, l'accumulation de récepteurs dans des vésicules intracellulaires peut provenir soit d'une accélération de l'internalisation constitutive (en l'absence de ligand), soit d'un blocage du recyclage suite à cette internalisation. Lors d'une stimulation aiguë de la voie Ras/MAPK par EGF, l'expression de surface du récepteur CXCR4 exogène dans les cellules HEK293 est diminuée d'environ 25% en 15 minutes, et de 20% dans les cellules SupT1 exprimant le récepteur natif. Les travaux de Signoret et ses collègues montrent une internalisation constitutive de CXCR4 de l'ordre de 1% des récepteurs membranaires par minute dans les cellules SupT1 (381). D'après ces chiffres, si l'accumulation des récepteurs CXCR4 à l'intérieur de la cellule provenait d'un blocage du recyclage constitutif, nous devrions observer la séquestration de 15% des récepteurs membranaires en 15 minutes. Les résultats que nous avons obtenus dans les cellules SupT1 ne permettent donc pas d'écarter cette hypothèse. Cependant, ce mécanisme de séquestration intracellulaire est conservé pour d'autres récepteurs, dont V2R. Or classiquement, après internalisation, V2R est dirigé vers les voies de dégradation et non de recyclage. Ceci, ajouté au fait que le mécanisme soit dépendant d'arrestine qui joue un rôle central dans l'internalisation des RCPG, favorise plutôt l'hypothèse d'une accélération de l'internalisation constitutive.

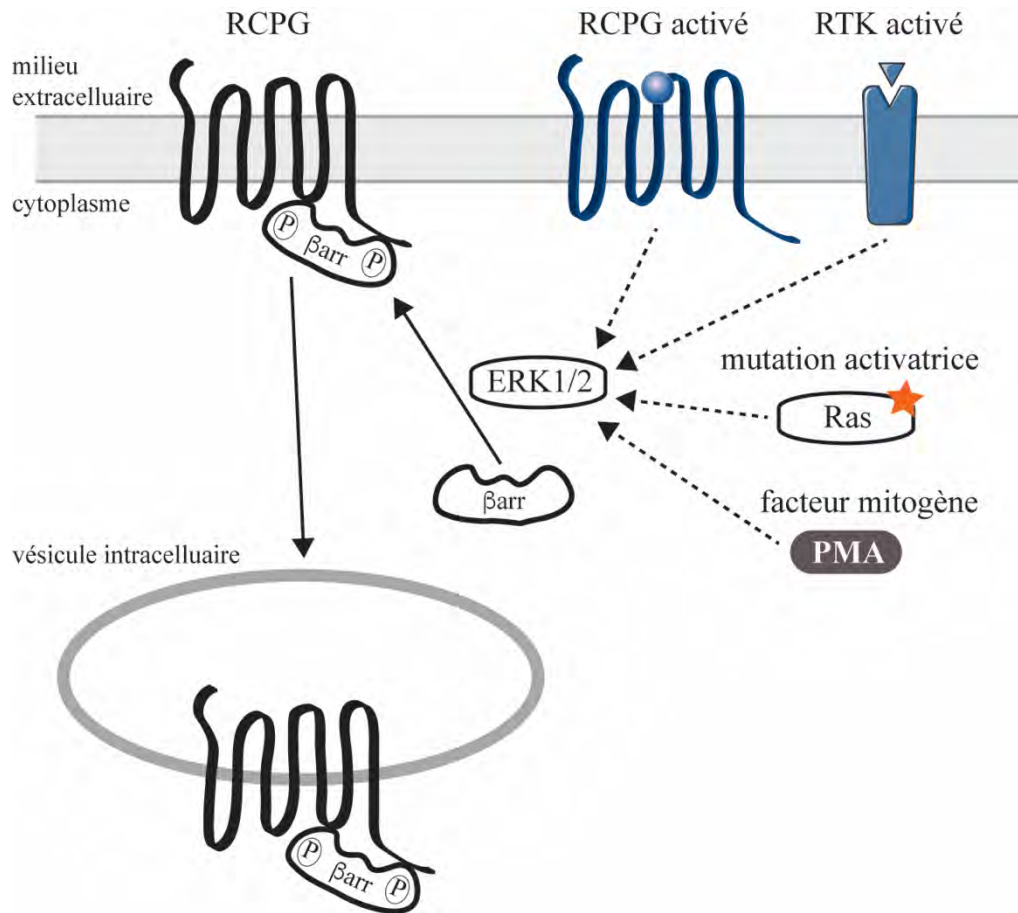


Figure 19. Modèle de régulation par ERK1/2 du trafic des RCPG

L'activation de ERK1/2 par un RCPG, un RTK, un facteur mitogène ou encore une mutation activatrice de la voie Ras/MAPK entraîne la phosphorylation de β -arrestine sur les résidus Ser14 et Thr276. β -arrestine est alors recrutée au récepteur et favorise son internalisation en absence de ligand. (PMA, myristate acétate de phorbol ; β arr, β -arrestine)

L'identification des vésicules contenant les récepteurs internalisés pourrait participer à la validation de cette hypothèse. Pour cela, nous disposons d'une nouvelle technique développée récemment dans les laboratoires de Michel Bouvier et Stéphane Laporte : la mesure par BRET du trafic des RCPG à l'aide de biosenseurs de localisation (« enhanced bystander BRET » ou EbBRET) [Figure 20] (216). Ces biosenseurs contiennent la protéine rGFP (*renilla* GFP) fusionnée à une séquence spécifique qui permet son ancrage dans un compartiment cellulaire cible : membrane plasmique, endosome précoce ou tardif, ou encore vésicule de recyclage [Tableau II]. La protéine d'intérêt, ici le récepteur, agit comme donneur et est fusionnée à une RLuc (*renilla* luciférase). Il est alors possible de mesurer le changement de concentration du récepteur dans un des compartiments cibles. En tirant profit de l'interaction naturelle entre les deux chromophores RLuc et rGFP permettant d'améliorer le signal de BRET, ces biosenseurs peuvent être visualisés par microscopie, ce qui permet de confirmer visuellement les résultats obtenus par BRET et de valider la localisation subcellulaire du récepteur.

2.3. Phosphorylation d'arrestine par ERK1/2

Les résultats présentés dans l'article 1 démontrent que l'activation de ERK1/2 induit une phosphorylation de β -arrestine-2 sur les résidus Ser1 et Thr276. La phosphorylation de ces résidus est nécessaire pour induire la séquestration intracellulaire des RCPG. Or, d'après la littérature, lors de la liaison d'arrestine au récepteur, les résidus Lys11 et Lys12 du senseur phosphate reconnaissent la queue C-ter phosphorylée du récepteur activé [Figure 6, Introduction]. Cette interaction induit un changement de conformation d'arrestine qui permet la libération de son extrémité C-ter et l'exposition des motifs de liaison de plusieurs interacteurs, notamment AP-2. Dans notre cas, la Ser14 de β -arrestine-2 phosphorylée par ERK1/2 se trouve à proximité de ces deux résidus Lys. Ainsi, il est possible que ce résidu phosphate agisse comme un phosphomimétique de la queue C-ter d'un récepteur activé et facilite le recrutement d'arrestine aux RCPG inactifs, stimulant ainsi leur internalisation constitutive. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué *in vitro* des mesures de l'affinité des formes sauvage (wt), phosphomimétique (S14D/T276D ou 2D) et non-phosphorylable (S14A/T276A ou 2A) de β -arrestine-2 purifiée pour le récepteur β 2AR contenu dans des nano-disques lipidiques.

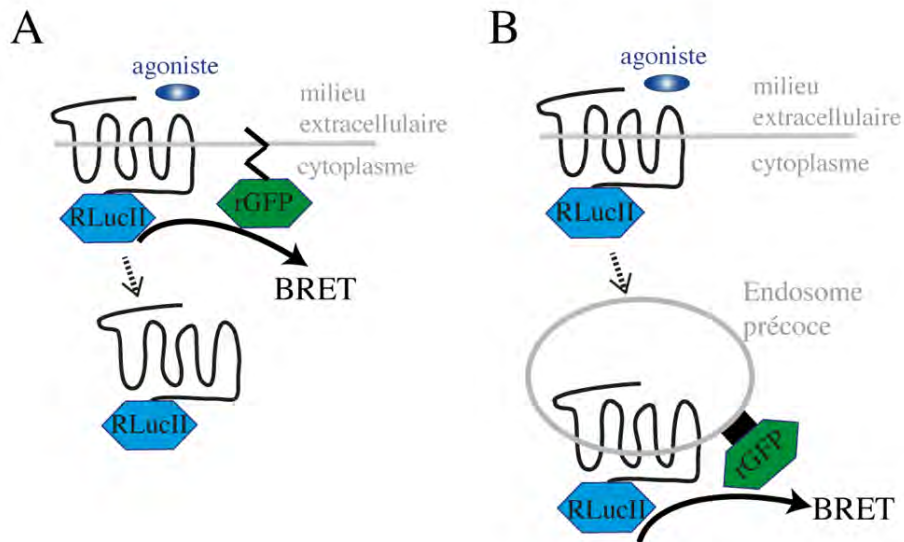


Figure 20. Bystander BRET et identification de compartiments subcellulaires

Illustration de deux biosenseurs EbBRET : rGFP-CAAX (A) et rGFP-FYVE (B). (A) Le biosenseur CAAX est utilisé pour mesurer la quantité relative de récepteurs à la surface. La rGFP est ancrée à la membrane par sa fusion au domaine polybasique de farnésylation CAAX de K-Ras. (B) Le biosenseur FYVE est utilisé pour mesurer la quantité relative de récepteurs dans les endosomes précoces. La rGFP est fusionnée au domaine endofine FYVE. Les rGFP membranaires et endosomales servent d'accepteurs pour les RCPG étiquetés RLucII pour générer un signal EbBRET.

Tableau II. Biosenseurs disponibles pour l'EbbRET

Biosenseur	Localisation	Commentaires
Lyn-rGFP	Membrane plasmique	Motif acylation de la kinase Lyn
rGFP-CAAX	Membrane plasmique	Motif de farnésylation de la kinase K-Ras
rGFP-FYVE	Endosome précoce	Domaine FYVE de l'endofine
NLS-rGFP	Noyau	NLS de l'antigène T de SV40
NES-rGFP	Cytoplasme	NES de PKI
rGFP-rab4	Endosome précoce	
rGFP-rab5	Vésicule à manteau de clathrine	
rGFP-rab7	Endosome tardif	
rGFP-rab9	Endosome tardif et <i>trans</i> -golgi	
rGFP-rab11	Endosome de recyclage	
rGFP-golgi	Golgi	73 premiers résidus de eNOS
rGFP-mitochondrie	Face cytoplasmique de la mitochondrie	Domaine C-ter de BCL-XL
rGFP-LifeAct	Filaments d'actine	

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de Vsevolod Gurevich (Vanderbilt University, Tennessee). Comme décrit dans la littérature (131, 132) et montré dans la Figure 21, β -arrestine-2 présente une affinité plus forte pour la forme phosphorylée par les GRK du récepteur (P- β 2AR) que pour la forme non-phosphorylée (β 2AR) (Section 2.4.1, Introduction). β -arrestine-2(2A) présente le même profil d'affinité que la forme wt. En revanche, β -arrestine-2(2D) a une affinité plus forte pour la forme non phosphorylée que pour la forme phosphorylée. Ce résultat supporte notre hypothèse que la charge introduite par la phosphorylation de β -arrestine-2 augmente l'affinité de cette dernière pour le récepteur non activé. La baisse d'affinité observée pour le récepteur phosphorylé pouvant quant à elle s'expliquer par une répulsion de charge entre la région du senseur phosphate, contenant P-Ser14, et la queue C-ter phosphorylée du récepteur.

D'après nos résultats, la phosphorylation d'arrestine doit s'effectuer sur les deux sites Ser14 et Thr276 pour que l'activation ERK1/2 induise une séquestration du RCPG. En effet, aucun des deux mutants non-phosphorylables, β -arrestine-2-S14A ou β -arrestine-2-T276A, ne restaure le mécanisme de séquestration de CXCR4 induit par ERK dans les cellules MEF KO β -arrestine-1/2. Or, le résidu Thr276 est éloigné du senseur phosphate et ne pourrait pas servir, comme Ser14, de phosphomimétique. En revanche, il est possible que sa phosphorylation soit nécessaire pour permettre la phosphorylation de la Ser14. Afin de déterminer si la phosphorylation de Thr276 est uniquement accessoire à la phosphorylation de Ser14, nous pourrions dans un premier temps comparer le profil d'affinité *in vitro* du mutant β -arrestine-2(S14D/T276D), à celui du mutant β -arrestine-2(S14D) pour β 2AR phosphorylé et non-phosphorylé. Si les profils sont identiques, cela supporterait l'hypothèse que seul le résidu Ser14 est impliqué dans le recrutement d'arrestine au récepteur non activé, et que la phosphorylation de Thr276 est certainement nécessaire pour permettre la phosphorylation de Ser14 dans les cellules. Sinon, le résidu Thr276 phosphorylé pourrait aussi participer de manière plus directe à l'interaction avec le récepteur, via une autre région que le senseur phosphate.

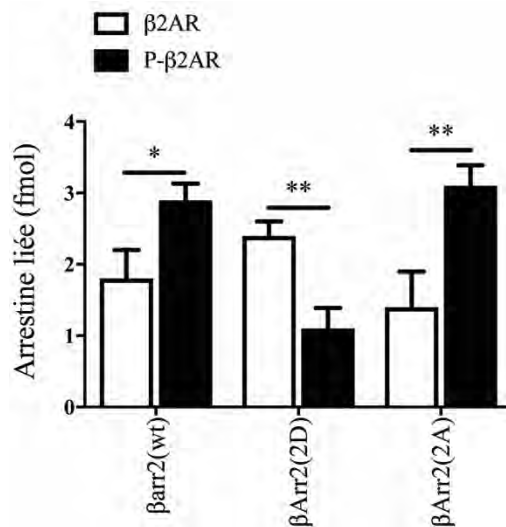


Figure 21. Affinité de β-arrestine-2 pour le récepteur β2Ar *in vitro*

Des nano-disques contenant β2AR ou phospho-β2AR (P-β2AR) sont incubés à 30°C avec β-arrestine-2(wt), β-arrestine-2(2D) ou β-arrestine-2(2A) purifiées et radiomarquées. Les échantillons sont refroidis sur glace puis les formes libres et liées de chaque β-arrestine sont séparées. Les résultats sont la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été déterminées par un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de type Sidak. (**P < 0.01; *P < 0.05).

2.4. Modulation des RTK par arrestine

Il est possible que le mécanisme de séquestration induit par ERK1/2 et observé pour les RCPG, soit conservé pour certains RTK. Les RTK, qui activent la cascade de signalisation Ras/MAPK, sont généralement activés par un agoniste extracellulaire qui induit la dimérisation du récepteur et son autophosphorylation sur des résidus Tyr de la boucle d'activation cytosolique du domaine kinase (382). Ces phospho-Tyr constituent alors un site d'ancrage pour différents effecteurs, tels que Src ou Grb2, (383). Les RCPG sont aussi capables de stimuler les RTK par transactivation (384). Il existe trois principaux mécanismes qui dépendent tous des protéines G (384). Le premier repose sur l'activation par un des effecteurs des sous-unités $G\alpha$ ou $G\beta\gamma$ (par exemple : Ca^{2+} , PKC, Src ou Pyk2) d'une métalloprotéase membranaire qui clive un pro-ligand accroché à la partie extracellulaire de la membrane plasmique, générant un ligand actif qui se lie au RTK. Deuxièmement, l'activation de Src ou Pyk2 peut aussi conduire à une transphosphorylation directe des Tyr activatrices des RTK. Enfin, la stimulation des RCPG entraîne parfois la phosphorylation de $p47^{phox}$ activant la NADPH oxydase générant des dérivés réactifs de l'oxygène qui oxydent et inhibent les phospho-Tyr-phosphatases, ce qui perturbe l'équilibre de phosphorylation en faveur de l'activation des RTK.

Or, les arrestines régulent de plusieurs manières l'activation des RTK. Premièrement, le recrutement d'arrestine au récepteur bloque l'activation des protéines G ce qui conduit à une baisse de la transactivation. Deuxièmement, les arrestines participent directement à l'internalisation d'au moins un RTK : le récepteur à l'insuline IGF-1R, dont l'endocytose est potentialisée lors de la surpression de β -arrestine-1 ou β -arrestine-2 et inhibée par l'expression du mutant dominant négatif β -arrestine-1-S412D (385). Or, le mécanisme de régulation que nous décrivons dans l'article 1 repose sur la capacité du récepteur à être internalisé de manière dépendante d'arrestine. Si ce mécanisme de régulation par ERK1/2 de l'expression de surface des RCPG est bien transposable aux RTK, alors l'arrestine serait au cœur de la régulation de la capacité de réponse des cellules à l'activation des deux plus grandes familles de récepteurs membranaires.

2.5. Un récepteur, plusieurs voies d'internalisation

Nous avons introduit dans le premier chapitre (Section 2.4, Introduction), les différents modes d'internalisation des RCPG, et bien que la plupart de ces récepteurs utilisent les arrestines, ce n'est pas le cas de tous.

Dans l'article 1, CXCR4 a servi de récepteur modèle pour notre étude. Les données de la littérature suggèrent que l'internalisation de CXCR4 est dépendante des β -arrestines car la surexpression des β -arrestines dans des cellules HEK293 potentialise l'endocytose du récepteur après traitement par l'agoniste CXCL12 (386). Toutefois, comme cela a été souligné par Chris Koppen et Karl Jakobs (387), la meilleure manière de déterminer si un RCPG peut internaliser ou non de façon indépendante d'arrestine est d'utiliser des cellules KO β -arrestines-1/2. Pour cela, nous avons utilisé des cellules HEK293, dont le génome a été édité par CRISPR/Cas9 pour supprimer l'expression de β -arrestine1/2 (388), et dans lesquelles nous avons mesuré la perte de surface du récepteur induite par le ligand. Comme contrôle, nous avons utilisé le récepteur AT1R dont l'internalisation a été rapportée dans la littérature comme étant arrestine-dépendante dans un contexte expérimental similaire (387). Comme attendu, l'internalisation d'AT1R induite par l'agoniste AngII est bien abolie dans les cellules HEK KO β -arrestines-1/2, et peut être restaurée par l'expression exogène de β -arrestine-2. En revanche, l'internalisation de CXCR4 est très peu diminuée en absence de β -arrestine1/2 [Figure 22] suggérant une internalisation indépendante d'arrestine. Les données de la littérature et nos résultats expérimentaux suggèrent donc que CXCR4 peut internaliser à la fois de manière arrestine-dépendante et indépendante, sans que le mécanisme conduisant à la sélection de l'une ou l'autre de ces voies ne soit élucidé. Dans l'article 1, nous démontrons que l'activation de ERK1/2 entraîne une séquestration de CXCR4 qui est entièrement dépendante d'arrestine. L'ensemble des résultats obtenus sur le récepteur CXCR4 illustre donc bien la complexité des mécanismes régulant l'endocytose des RCPG. La multiplicité de ces mécanismes permet certainement à la cellule de moduler avec précision l'activité signalétique des RCPG en fonction des conditions physiologiques. Différents mécanismes d'endocytose pourraient aussi induire différents profils de signalisation endosomale, en permettant par exemple l'internalisation du récepteur seul versus le récepteur en complexe avec arrestine.

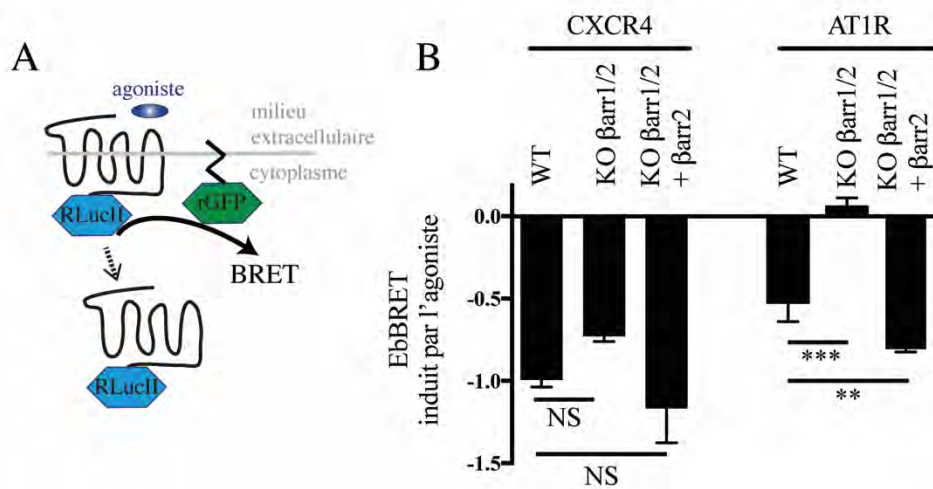


Figure 22. Internalisation de CXCR4 en absence d'arrestine

(A) Représentation schématique du biosenseur rGFP-CAAX. La stimulation du récepteur entraîne sa relocalisation de la membrane plasmique vers les endosomes, ce qui se traduit par une diminution de l'EbBRET. (B) Cellules HEK293wt ou KO β -arrestine-1/2 (KO β arr1/2) exprimant de manière transitoire CXCR4-RLucII ou AT1R-RLucII, ainsi que rGFP-CAAX et β -arrestine-2 (β arr2). Ces cellules sont stimulées avec 200 nM de CXCL12 pour activer CXCR4, ou 1 mM d'AngII pour activer AT1R, pendant 30 minutes avant la lecture du signal de BRET. La diminution du signal EbBRET en présence d'agoniste est proportionnelle à la perte de récepteurs de surface, i.e. à l'internalisation. Les résultats sont la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences indépendantes. Les statistiques ont été déterminées par un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de type Dunnett contre le signal obtenu dans les cellules HEK293wt. (***) $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; ns = non significatif).

2.6. Modification du surfaceome par la voie Ras/MAPK

L'ensemble des données de l'article 1 démontre que l'activation de la voie ERK/MAPK altère le trafic des récepteurs CXCR4, V2R, AT1R et potentiellement de l'ensemble des RCPG qui interagissent avec arrestine. Nous avons aussi discuté de la possibilité que ce phénomène touche certains RTK. Il serait donc intéressant d'adopter une approche plus globale pour suivre les changements d'expression à la surface des protéines membranaires, et en particulier des récepteurs, induits par l'activation de ERK.

L'étude du protéome de la surface cellulaire (ou surfaceome), représente un défi technique dû à l'hydrophobicité des protéines membranaires qui complique leur solubilisation et leur purification. Ces dernières années, la combinaison de nouvelles approches chimioprotéomiques employant des sondes chimiques qui capturent spécifiquement les protéines de surface, avec la spectrométrie de masse, a permis de faciliter la caractérisation du surfaceome.

Récemment, le laboratoire de Philippe Roux a mis au point une méthode basée sur le marquage des protéines membranaires à l'aide de réactifs biotinylés imperméables, à la suite de quoi les protéines sont purifiées par chromatographie en phase liquide puis identifiées et quantifiées par spectrométrie de masse. Deux réactifs différents sont utilisés : l'aminooxy-biotine (AO-biotine) et la sulfo-NHS-LC-biotine (LC-biotine), qui se lient respectivement à un groupement d'acide sialique ou une amine primaire de glycoprotéines. Ces deux marquages sont effectués en parallèle, et devraient permettre d'obtenir des profils d'expression comparables. Toutefois, certaines protéines pourraient être plus facilement capturées par un réactif que par l'autre. L'avantage de cette méthode est de pouvoir travailler avec les protéines endogènes de la cellule et effectuer une analyse comparative du surfaceome dans plusieurs conditions de stimulation.

Cette technique peut par exemple être utilisée pour comparer le surfaceome de cellules dont la voie ERK/MAPK aura ou non été activée. Pour cela, la voie sera stimulée soit de manière aiguë à l'aide d'un agent mitogène tel que le PMA ou d'un facteur de croissance comme EGF, soit de manière plus prolongée en exprimant de façon transitoire un mutant constitutivement actif de la voie. Les premiers résultats obtenus (données non présentées) corroborent les conclusions de notre article et montrent une diminution globale de l'expression de surface de plusieurs RCPG

lors de l'activation de la voie ERK/MAPK avec le mutant H-Ras-G12V. D'après ces résultats, parmi les 17 RCPG détectés, 14 présentent une diminution de leur expression de surface après activation de la voie ERK/MAPK alors que deux sont très légèrement enrichis et un seul, le récepteur à l'acide lysophosphatidique LPAR1, est fortement enrichi. Or d'après la littérature, l'internalisation de LPAR1 est dépendante de l'arrestine et de la clathrine (389). Cette différence ne peut donc pas être expliquée par une absence d'interaction avec arrestine. Il est intéressant de noter que l'expression de surface des RTK est aussi globalement diminuée lors de l'activation de la voie ERK/MAPK. Toutefois, nous ne sommes pas en mesure avec les données actuelles de faire un lien direct entre ces résultats et le mécanisme de régulation que nous avons précédemment décrit.

3. Développement de nouveaux outils pharmacologiques pour l'étude de la signalisation intracellulaire des RCPG

Les arrestines ont une grande importance dans la régulation et la signalisation des RCPG et quelques outils sont disponibles afin d'étudier leurs fonctions. Il existe des outils génétiques comme les ARN interférents qui permettent de réduire l'expression d'un isoforme cible d'arrestine dans une lignée cellulaire choisie (390). Des souris KO pour β -arrestine-1, β -arrestine-2 et β -arrestine-1/2 ont aussi été générées (90). Les souris KO β -arrestine-1 ou β -arrestine-2 fournissent un modèle pour l'étude *in vivo* du rôle spécifique de chacun de ces isoformes. Il est intéressant de noter que ces souris n'ont pas de phénotype majeur alors que la souris KO pour β -arrestine-1/2 présente un phénotype létal au stade embryonnaire, ce qui suggère une redondance de fonction entre les deux isoformes. Ces trois KO chez la souris ont permis de dériver des lignées immortalisées de fibroblastes d'embryon de souris (MEF) (90). Plus récemment, la technique CRISPR/Cas9 a été utilisée sur des cellules HEK293 pour éliminer sélectivement β -arrestine-1 et/ou β -arrestine-2 du génome (388). Ces cellules permettent de travailler dans un modèle cellulaire humain et non murin, et présentent une meilleure efficacité de transfection que les MEF.

Il existe peu d'outils pharmacologiques permettant d'étudier la fonction d'arrestine. Or, ils sont particulièrement intéressants car ils modulent à court terme la cible, ce qui permet de

s'affranchir en grande partie des mécanismes de compensation qui peuvent apparaître lors de l'utilisation de cellules KO ou d'ARN interférents. En dehors des agonistes des RCPG, il existe seulement un activateur pharmacologique des β -arrestines : les colorants de tryphenylmethane. Ces molécules activent le recrutement d'arrestine à la clathrine indépendamment de l'activation d'un récepteur. Concernant son effet sur la réponse des RCPG, le traitement avec cet activateur inhibe la production d'AMPc et stimule l'activation de ERK1/2, mais l'existence d'un lien direct entre ces résultats et une potentialisation du recrutement d'arrestine au récepteur reste à confirmer (391). D'autre part, plusieurs inhibiteurs de l'endocytose, non spécifiques à arrestine ou aux RCPG, sont disponibles commercialement et permettent l'inhibition de la signalisation intracellulaire des récepteurs. Toutefois, l'inhibiteur Barbadin, décrit dans l'article 2, représente le premier outil pharmacologique permettant d'inhiber spécifiquement la fonction endocytaire des arrestines.

3.1. Criblage virtuel basé sur la structure

Ces dernières années, plusieurs structures des arrestines seules ou en complexes avec différents effecteurs ont été publiées [Tableau III]. L'étude de ces structures, souvent couplée à de la mutagenèse dirigée, permet à la fois de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'activation de cette protéine mais aussi de définir avec précision les surfaces d'interaction avec des effecteurs. Dans le but de développer un inhibiteur de l'internalisation dépendante d'arrestine, qui permette de différencier le rôle du recrutement d'arrestine au récepteur de celui du complexe d'internalisation dans les événements de signalisation endosomale, nous avons ciblé l'interaction entre arrestine et la sous-unité $\beta 2$ d'AP-2. En effet, la plupart des RCPG internalisent via un mécanisme arrestine/AP-2/clathrine dépendant, où AP-2 sert de pont moléculaire entre le récepteur et les molécules de clathrine (Section 2.4.3, Introduction). Nous avons pu utiliser la surface d'interaction définie par le cristal de la sous-unité $\beta 2$ -adaptine en complexe avec le peptide C-ter de β -arrestine-1, pour cribler virtuellement des petites molécules venant se fixer dans cette poche de liaison.

Tableau III. Liste des structures cristallographiques des arrestines

Structure cristallographique	Année de publication	# PDB	Référence
Arrestine-1 liée à la rhodopsine	2016	5DGY	(392)
	2015	4ZWJ	(108)
Arrestine-1-R175E	2015	4ZRG	(393)
Peptide correspondant à la boucle <i>finger</i> d'arrestine-1 lié au récepteur opsine activé	2014	4PXF	(115)
Forme mutante pré-activée d'arrestine-1 : p44	2013	4J2Q 3UGU 3UGX	(107, 394)
β -arrestine-1 active liée à V2Rpp (phosphopeptide de la queue C-ter de V2R)	2013	4JQI	(106)
Arrestine-3 (β -arrestine-2)	2011	3P2D	(95)
Arrestine-2 (β -arrestine-1)	2009	2WTR	
	2002	1JSY	(395)
	2001	1G4M 1G4R	(93)
Arrestine-2 (β -arrestine-1) liée à clathrine	2009	3GC3 3GD1	(94)
Arrestine-2 (β -arrestine-1) liée à β 2- adaptine (AP-2)	2006	2IV8	(164)
Arrestine-2 (β -arrestine-1) liée à IP6	2006	1ZSH	(396)
Arrestine-4	2005	1SUJ	(96)
Arrestine-1	1999	1CF1	(92)
	1998	1AYR	(91)

Depuis le début des années 2000, le criblage de petites molécules basé sur la structure de la cible rencontre de plus en plus de succès, en particulier dans l'industrie pharmaceutique. Contrairement aux méthodes de criblage à haut débit classiques (ou HTS), cette technique rationalisée s'appuie sur des programmes informatiques d'amarrage moléculaire utilisant une librairie de petites molécules, classant celles-ci en fonction de la prédiction de leur activité. Les plus grosses librairies peuvent contenir plusieurs centaines de millions de composés, et il serait irréaliste de vouloir tester autant de composés dans un essai HTS classique.

Dans notre cas, le programme utilisé (AutoDock4) privilégie les interactions favorables entre la protéine cible et la molécule testée et calcule une énergie de liaison. Plus cette énergie de liaison est basse plus le score attribué à la molécule est élevé. Ce criblage virtuel est suivi d'un criblage de confirmation à petite échelle utilisant un essai cellulaire qui teste uniquement un nombre limité de composés préalablement sélectionnés. Nous avons choisi de cribler virtuellement la librairie MyriaScreenII qui contient 10000 composés disponibles commercialement (TimTec et Sigma Aldrich). Ces composés ont été soigneusement sélectionnés pour la diversité et la pertinence de leur structure pour le criblage. À la suite du criblage virtuel, nous avons sélectionné 52 molécules parmi les 196 ayant reçu le meilleur score, et nous les avons testées dans un essai cellulaire mesurant par BRET l'interaction entre la sous- β 2-adaptine et β -arrestine-1 post-stimulation du récepteur V2R. Le pré-criblage *in silico* a permis de faire passer le taux de succès de notre criblage *in cellulo* de 0.02% (2 hits pour 10000 molécules testées) à 4.9% (2 hits pour 41 molécules testées – 11 composés perturbant le signal de luminescence ayant été écartés).

Le criblage virtuel présente aussi un atout majeur par rapport au criblage HTS : il permet de cibler spécifiquement une partie de la molécule d'intérêt. Dans notre cas, nous cherchons à inhiber l'endocytose des RCPG en ciblant spécifiquement l'interaction arrestine/AP-2. Or, arrestine et AP-2 servent de plateforme d'interaction pour plusieurs composants de la machinerie d'endocytose, donc le fait de cibler spécifiquement la poche de liaison d'arrestine sur la sous-unité β 2 d'AP-2 permet de réduire la proportion de hits non-spécifiques. La même approche pourrait être utilisée pour inhiber l'internalisation dépendante d'arrestine, par exemple en ciblant la zone de contact entre la boucle *finger* et le récepteur, ou encore la liaison d'arrestine

à IP6 ou à la clathrine. Dans la section suivante, nous discuterons du développement d'un autre inhibiteur de l'endocytose des RCPG et des arrestines qui cible cette fois le cœur polaire d'arrestine, une des régions essentielles à l'activation de la molécule lors du recrutement à un récepteur activé.

3.2. Inhibiteur de l'interaction β -arrestine/RCPG

La même approche de criblage virtuel est utilisée actuellement dans le laboratoire de Michel Bouvier pour le développement d'un inhibiteur de l'interaction entre β -arrestine-1/2 et un RCPG activé. Nos connaissances actuelles mettent en relief l'importance du cœur polaire d'arrestine dans la stabilisation de la forme inactive d'arrestine. Les structures cristallographiques montrent que l'interaction entre arrestine et la queue C-ter phosphorylée du récepteur activé conduit à une rupture des liens hydrogènes du cœur polaire et un réarrangement de la conformation de la molécule. À partir de la structure 3D de β -arrestine-1, criblage virtuel et essai *in cellulo* ont été combinés pour identifier des petites molécules organiques interférant avec l'engagement d'arrestine au récepteur, en ciblant spécifiquement le cœur polaire de celle-ci.

Le traitement des cellules avec le composé le plus actif, UM0012685, induit une inhibition du recrutement de β -arrestine-1 et de β -arrestine-2 au récepteur V2R activé, qui se traduit par une diminution significative de son internalisation [Figure 23].

Avec cette nouvelle molécule, nous aurions donc à notre disposition :

- Un inhibiteur de recrutement d'arrestine au récepteur (UM0012685)
- Un inhibiteur de l'interaction arrestine/AP-2 (Barbadin)
- Un inhibiteur commercial de la clathrine (PitStop2)
- Un inhibiteur commercial de la dynamine (Dyngo-4a)

Cette boîte à outils devrait permettre de déterminer l'importance de chaque étape menant à l'internalisation du récepteur dans la capacité de ce dernier à activer les voies de signalisation non-canoniques des arrestines et des protéines G. Par exemple, il a été rapporté dans la littérature que Src peut être activée par le complexe arrestine/récepteur à la membrane plasmique, mais

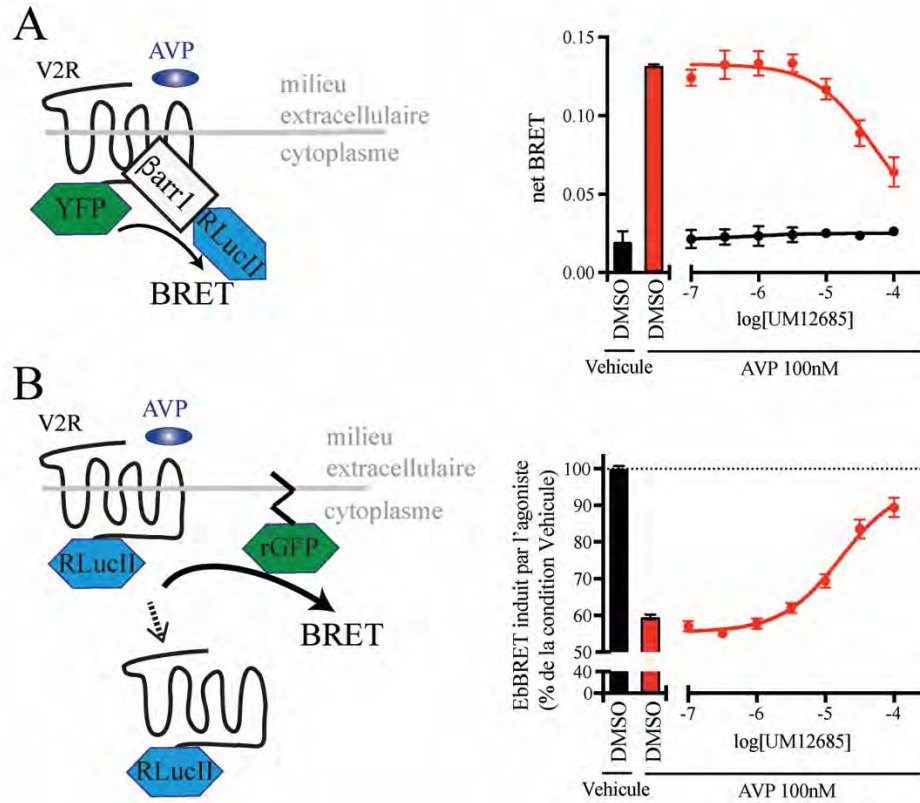


Figure 23. Inhibition de l'internalisation de V2R par UM012685

(A, gauche) Représentation schématique du recrutement de β -arrestine au V2R mesurée par BRET. (A, droite) Des cellules HEK293 exprimant de manière transitoire V2R-YFP et β -arrestine-1-RLucII sont stimulées 15 minutes avec 100 nM d'AVP après avoir été incubées 30 minutes avec 1% DMSO ou UM0012685 à la concentration indiquée avant la lecture du signal BRET.

(B, gauche) Représentation schématique du biosenseur CAAX. (B, droite) Des cellules HEK293 exprimant de manière transitoire V2R-RLucII et rGFP-CAAX sont stimulées 30 minutes avec 100 nM d'AVP après avoir été incubées 30 minutes avec 1% DMSO ou UM0012685 à la concentration indiquée avant la lecture du signal BRET. Les résultats sont la moyenne \pm la déviation standard de 3 expériences indépendantes.

l'engagement de ce complexe avec AP-2 ou clathrine est-il nécessaire pour activer Src ? De la même manière, les données de la littérature favorisent une activation endosomale de la voie ERK/MAPK, toutefois l'utilisation de ces différents inhibiteurs pourrait permettre de déterminer exactement quelle étape de l'internalisation est cruciale pour la formation du signalosome. Par exemple, si ce signalosome est formé au niveau des endosomes, alors les quatre types d'inhibiteurs devraient bloquer son assemblage ; alors que s'il se forme juste après le recrutement d'arrestine au récepteur ou encore dans les puits recouverts de clathrine, certaines de ces molécules n'inhiberont pas sa formation.

3.3. Confirmation du hit « Barbadin »

Nous avons suivi un processus traditionnellement appliqué en HTS afin de valider le hit obtenu, que nous appellerons Barbadin (**β -arrestine/ β 2-adaptine inhibiteur**) (397). Dans un premier temps, nous avons confirmé la reproductibilité des résultats obtenus lors du criblage *in cellulo* en répétant la même expérience trois fois de manière indépendante. Puis, nous avons déterminé la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) du composé dans ce même essai.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le mode de liaison du composé à l'aide d'une simulation *in silico* d'amarrage moléculaire sur la sous-unité β 2-adaptine. Les similarités observées entre la pose du composé dans la poche de β 2-adaptine et celle adoptée par β -arrestine dans la structure du co-cristal, ainsi que la diminution d'activité pour certains analogues de Barbadin découlant de la perte des liaisons hydrophobes et hydrogènes mimant celles existantes entre β -arrestine-1 et β 2-adaptine, supportent le mode de liaison proposé. Afin de valider davantage ce mode de liaison, nous avons validé *in vitro* l'interaction entre Barbadin et β 2-adaptine à l'aide d'essais de dénaturation thermique. L'augmentation de la température de demi-dénaturation (T_m) de β 2-adaptine augmente en présence de Barbadin, et ce de manière dose-dépendante, ce qui confirme la liaison du composé à la protéine.

Dans un troisième temps, nous avons confirmé l'action inhibitrice de Barbadin dans plusieurs essais orthogonaux, afin de s'affranchir de possibles artéfacts liés à notre essai primaire : co-immunoprécipitation de β -arrestine/ β 2-adaptine, co-localisation de β -arrestine/ β 2-adaptine par microscopie confocale, et internalisation des RCPG par cytométrie de flux, EbBRET ou

microscopie confocale. Les résultats obtenus nous ont permis de valider l'action inhibitrice de Barbadin sur l'interaction arrestine/AP-2 et sur l'internalisation des RCPG, ainsi que de confirmer l'IC₅₀ du composé dans différentes conditions expérimentales.

Étant donné la forte homologie de séquences entre β -arrestine-1 et β -arrestine-2 au niveau du motif d'interaction avec la sous-unité β 2 d'AP-2 [Figure 24], il n'est pas surprenant que Barbadin inhibe l'interaction de β -arrestine-2/ β 2-adaptine avec la même puissance et efficacité que β -arrestine-1/ β 2-adaptine. Nos résultats valident aussi l'inhibition de l'interaction arrestine/AP-2 et de l'internalisation suite à la stimulation de plusieurs RCPG, de classe A comme de classe B : V2R, AT1R et β 2AR. Enfin, nous avons validé l'action de Barbadin dans un système natif en mesurant l'endocytose du récepteur AT1R endogène par liaison d'un radio-ligand sur des cellules musculaires lisses vasculaires. Toutes ces propriétés font de Barbadin un outil précieux pour l'étude des RCPG.

Pour terminer, plusieurs contrôles nous ont permis de valider la spécificité d'action de Barbadin. Nous avons d'abord exclu l'hypothèse que la diminution d'interaction observée entre β -arrestine et β 2-adaptine puisse provenir d'une inhibition du recrutement d'arrestine au récepteur activé. Puis, nous avons démontré par précipitation GST (« GST pull-down ») et co-immunoprécipitation, que Barbadin n'affecte pas l'interaction entre β 2-adaptine et d'autres composants de la machinerie endocytaire (epsine et clathrine), alors qu'elle perturbe efficacement la formation du complexe arrestine/AP-2. Pour aller encore plus loin, nous avons utilisé le récepteur à l'endothéline (ETaR) qui internalise via les calvéoles par un mécanisme dépendant d'arrestine mais indépendant d'AP-2/clathrine, et le récepteur à la transferrine (TfR) qui s'associe à AP-2 et internalise via les puits recouverts de clathrine indépendamment d'arrestine. Le traitement par Barbadin n'a pas d'effet sur l'internalisation induite par le ligand des récepteurs ETaR et TfR, ce qui montre que cette molécule inhibe uniquement un sous-ensemble des mécanismes d'internalisation dépendant à la fois d'arrestine et d'AP-2.

β -arrestine-1 (375-394) DDDIVFEDFARQRLKGMKDD
 β -arrestine-2 (382-401) DDDIVFEDFARLRLKGMKDD

Figure 24. Séquences du C-ter β -arrestine-1 et β -arrestine-2

Séquences partielles de l'extrémité C-ter de β -arrestine-1 et β -arrestine-2. La numérotation des acides aminés représentés est indiquée entre parenthèses. Le motif d'interaction avec AP-2 (D/ExxFxx[F/L]xxxR) est en rouge. Les acides aminés qui diffèrent entre β -arrestine-1 et β -arrestine-2 sont soulignés.

3.4. Barbadin et signalisation des RCPG

Barbadin inhibe de manière significative la production d'AMPC induite par la stimulation des récepteurs V2R et β 2AR, ce qui corrèle avec le nouveau modèle de signalisation des protéines G depuis les endosomes (Section 3.2, Introduction). Cet effet est bien dû à l'inhibition de l'internalisation du récepteur, car nous avons démontré que Barbadin n'inhibe ni l'activation de la protéine G à des temps courts (3 minutes post-stimulation), ni la production d'AMPC induite par la forskoline.

Nous avons aussi testé l'effet de Barbadin sur la signalisation endosomale dépendante des arrestines, en mesurant l'activation de ERK1/2. Les résultats obtenus démontrent une contribution partielle d'arrestine à l'activation de ERK1/2 dans le cas du β 2AR et quasi-exclusive pour V2R [Figure 25]. Ces résultats corrèlent avec les données de la littérature qui suggèrent qu'un récepteur de classe B qui interagit de manière stable avec arrestine lors de son internalisation, comme V2R, active ERK1/2 de manière plus efficace et plus soutenue via β -arrestine qu'un récepteur de classe A qui n'interagit que de manière transitoire, comme β 2AR, et donc dépend davantage des protéines G pour activer ERK1/2.

3.5. Relation structure à activité

Le composé Barbadin possède un IC_{50} de l'ordre de 10 μ M dans les différents essais cellulaires effectués, incluant l'internalisation médiée par le complexe β -arrestine/AP-2/clathrine de plusieurs RCPG. Cet IC_{50} est comparable à ceux rapportés pour d'autres inhibiteurs commerciaux tels que :

- Dyngo-4a (Abcam), inhibiteur de la dynamine, qui bloque l'internalisation médiée par la clathrine avec un IC_{50} de 5.5 μ M (selon les indications du fabricant)
- PitStop2 (Abcam), inhibiteur de la clathrine, qui bloque l'association entre la clathrine et l'amphiphisine avec un IC_{50} de 12 μ M (selon les indications du fabricant)

Le composé Barbadin présente aussi une efficacité similaire à ces deux inhibiteurs commerciaux, qui se traduit par une inhibition maximale d'environ 50% de l'internalisation.

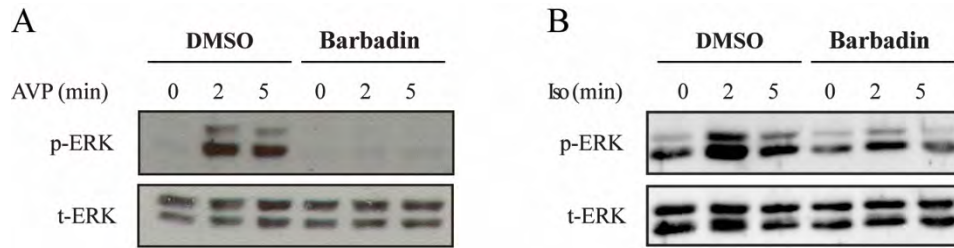


Figure 25. Inhibition de l'activation de ERK1/2 par Barbadin

Cinétique de la phosphorylation de ERK1/2 dans des cellules HEK293 exprimant de manière transitoire V2R (A) ou β 2AR (B). Les cellules sont pré-traitées pendant 30 minutes avec du DMSO ou Barbadin (50 μ M) avant d'être stimulées avec AVP (100 nM, A) ou Iso (1 μ M, B) pour la durée indiquée.

Afin d'améliorer la puissance et l'efficacité pharmacologique de notre molécule, nous avons lancé une phase d'optimisation du composé, en collaboration avec la plateforme de chimie médicinale de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancer. Pour cela, nous allons établir des relations quantitatives structure-activité (QSAR) en associant les propriétés moléculaires d'analogues de Barbadin à des mesures expérimentales de leur activité inhibitrice sur l'interaction β -arrestine-1/ β 2-adaptine induite par l'activation de V2R. Pour le moment, nous avons généré 20 analogues qui seront testés *in cellulo* pour déterminer quelles modifications chimiques permettent une amélioration de l'activité du composé [Figure 26]. Ces études pourront être couplées à la conception de nouveaux analogues basés sur la structure de la poche de liaison de β 2-adaptine. Nous aurons aussi pour objectif d'améliorer certaines propriétés physico-chimiques du composé telle que sa solubilité.

4. Développement de nouveaux biosenseurs pour l'étude de la signalisation des RCPG

4.1. Validation du biosenseur PTEN

Des études biochimiques et microscopiques ont mis en évidence un modèle conformationnel d'activation de PTEN (voir section 3.1.4). La phosphorylation constitutive de PTEN au niveau de résidus Ser/Thr de sa queue C-ter bloque la phosphatase dans une conformation fermée inactive, où les résidus phosphorylés interagissent avec le domaine N-ter de liaison au PIP2 réduisant la localisation membranaire et l'activité catalytique de PTEN. Au contraire, la déphosphorylation de PTEN entraîne une augmentation de son activité phosphatase, mais aussi une déstabilisation de la protéine (331).

Dans l'article 3, nous avons tiré profit de ce changement conformationnel pour développer un biosenseur intramoléculaire de PTEN basé sur la technologie BRET. Le transfert d'énergie entre l'accepteur et le donneur ne peut avoir lieu que si la luciférase (ici, RLuc) et la protéine fluorescente (ici, YFP) se trouvent à une distance inférieure à 100 Å et varie proportionnellement à la distance. Nous avons donc fusionné la RLuc à l'extrémité N-ter de

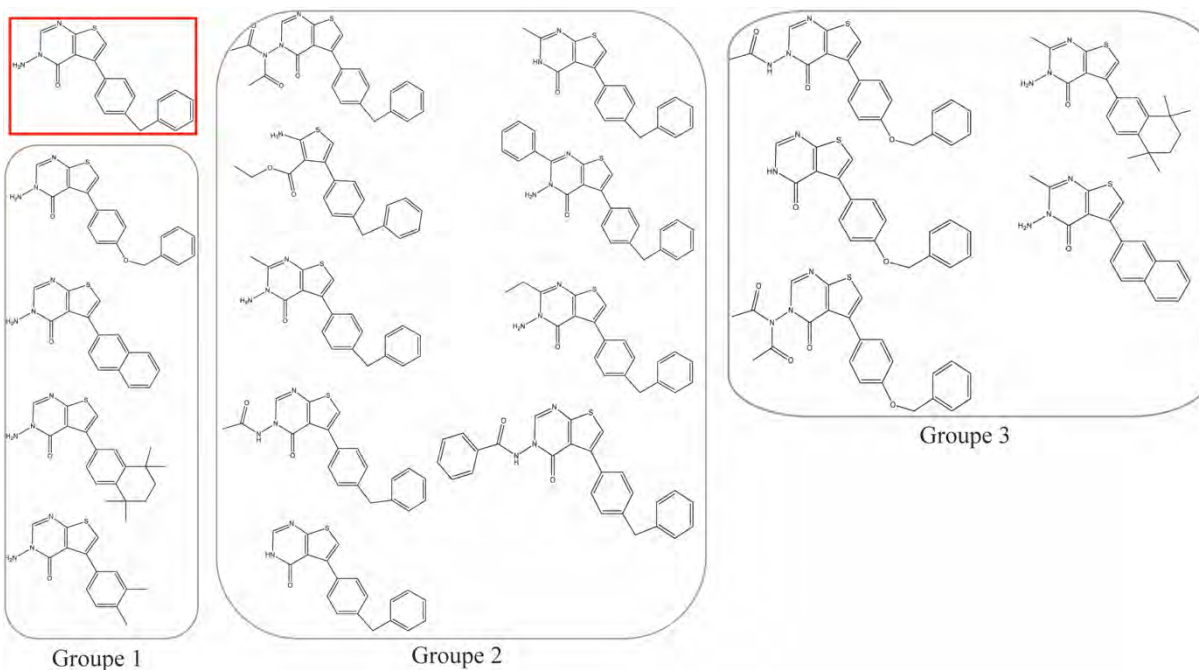


Figure 26. Analogues de Barbadin

La structure de Barbadin est encadrée en rouge. Les analogues ont été classés en trois groupes selon les modifications chimiques effectuées. Dans le groupe 1, le corps amino-thiénopyrimidinone est conservé, alors que le groupe benzyl-phenyl de Barbadin est modifié. À l'inverse, dans le groupe 2 le groupe benzyl-phenyl est constant et la modification de la partie amino-thiénopyrimidinone introduit de la diversité. Le groupe 3 présente les analogues conservant la partie amino-thiénopyrimidinone et faisant varier les autres substituants.

PTEN et YFP à son extrémité C-ter (RLuc-PTEN-YFP) afin d'étudier les changements de conformation de cette phosphatase suite à différents stimuli en temps réel et en cellules vivantes.

Plusieurs étapes de validation du biosenseur ont été nécessaires. Dans un premier temps, nous avons démontré que le biosenseur PTEN maintient une activité catalytique, et donc une capacité d'inhibition de la voie Akt, similaire à PTEN^{wt}. Nous avons aussi validé la localisation subcellulaire du biosenseur PTEN par microscopie. Enfin, nous avons vérifié la conservation de la capacité d'interaction de RLuc-PTEN-YFP avec β -arrestine-2 (341) par co-immunoprécipitation.

Toutefois, il est important de noter que les changements conformationnels observés avec le biosenseur pourraient ne pas toujours corrélérer avec l'activité catalytique de cette phosphatase. Ainsi, lors de l'application de ce biosenseur à un nouvel essai cellulaire, il est important d'établir au préalable cette corrélation à l'aide d'un autre test d'activité tel que la mesure des niveaux d'Akt activée ou bien la détermination de la localisation subcellulaire de PTEN.

L'utilisation de ce biosenseur a permis de valider le modèle conformationnel d'activation de PTEN en cellule entière. Par exemple, l'inhibition de la kinase CKII qui est responsable de la phosphorylation constitutive de PTEN et de la baisse de son activité catalytique, se traduit par une diminution de signal de BRET qui correspond à l'ouverture du biosenseur et donc à l'activation de la phosphatase

Ce biosenseur peut aussi être utilisé pour étudier les interactions entre PTEN et des effecteurs qui induisent un changement de conformation et/ou d'activité de PTEN. Par exemple, β -arrestine-2, connue pour interagir avec PTEN et l'activer, promeut un changement de conformation de la protéine qui peut être mesuré à l'aide du biosenseur. Toutefois, il est important de noter que l'interaction de PTEN avec certains interacteurs, en particulier ceux interagissant avec le domaine de liaison PDZ de l'extrémité C-ter pourrait être perturbée par la présence des fusions RLuc et YFP.

Dans une publication précédente (341), l'équipe de Mark Scott avait démontré par des méthodes biochimiques l'activation sélective de PTEN par le ligand S1P suite à la stimulation du récepteur à la sphingosine S1PR2, mais pas S1PR1. Les données obtenues à l'aide de ce

biosenseur récapitulent ces résultats. Dans notre étude, le biosenseur RLuc-PTEN-YFP a donc été utilisé pour mettre en évidence l'activation conformationnelle de PTEN suite à la stimulation d'autres RCPG : AT1R, TP α R et M1MR. Cette étude fournit donc une preuve de concept de l'utilité de ce biosenseur pour découvrir de nouveaux récepteurs pouvant moduler l'activité de PTEN, et ainsi fournir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

4.2. Utilisation du biosenseur PTEN pour un criblage d'inhibiteurs pharmacologiques

Étant donné l'importance thérapeutique de PTEN, ce biosenseur pourrait être utilisé pour cribler de petites molécules capables d'influencer son activité catalytique. Dans cette optique, l'équipe de Mark Scott a généré une lignée stable exprimant le biosenseur RLuc-PTEN-YFP de façon inductible et à un faible niveau d'expression, comparable à un niveau physiologique. Pour cela, la lignée cellulaire PC3, issue d'une tumeur de la prostate et n'exprimant pas PTEN a été choisie. De plus, les résultats publiés par Lima-Fernandes *et al.* (341) ainsi que ceux obtenus dans l'article 3 montrent à la fois la fonctionnalité du biosenseur PTEN dans les cellules PC3, et une sensibilité suffisante du biosenseur pour que celui-ci puisse être exprimé de manière exogène à un niveau comparable à PTEN endogène, ce qui valide la stratégie adoptée pour la lignée stable.

Une fois miniaturisé en plaque 384 puits, cet essai BRET pourra être utilisé pour cribler la banque de molécules de la plateforme HTS de l'IRIC, à la recherche de petites molécules organiques qui modulent le signal de BRET émanant du biosenseur. Lors de ce criblage, un inhibiteur de la kinase CKII pourra être utilisé comme contrôle positif. Ainsi, nous espérons pouvoir découvrir de petites molécules qui augmentent l'activité catalytique de PTEN, ce qui pourrait permettre de développer de nouveaux agents thérapeutiques restaurant la signalisation PTEN dérégulée dans de nombreux cancers.

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur l'étude des mécanismes de signalisation non-canoniques de β -arrestine. Dans le premier article, nous avons identifié deux nouveaux sites de phosphorylation de β -arrestine-2 par ERK1/2, Ser14 et Thr276, qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression de surface de plusieurs RCPG à l'état basal. Nos résultats suggèrent que ce mécanisme non-canonique d'internalisation dépendant d'arrestine, régule l'ensemble des récepteurs qui interagissent avec cette protéine d'échafaudage. En conséquence, le modèle proposé place ERK1/2 au centre de la régulation tonique de la capacité de réponse de la cellule aux différents stimuli qui activent les RCPG. De plus, l'activation de ces kinases étant dérégulée dans de nombreuses conditions pathologiques, incluant plusieurs cancers, le mécanisme que nous décrivons pourrait participer à une meilleure compréhension de ces processus pathophysiologiques.

Dans le deuxième article, nous identifions un inhibiteur, appelé Barbadin, qui bloque l'internalisation dépendante d'arrestine et d'AP-2 des RCPG. Ce composé est le premier inhibiteur pharmacologique des arrestines et représente un outil intéressant pour disséquer la contribution des arrestines, et particulièrement du complexe d'endocytose, dans différents phénomènes cellulaires et physiologiques, dépendants par exemple des voies de signalisation non-canoniques de β -arrestine.

Dans le troisième article, nous avons développé un nouveau biosenseur intramoléculaire de PTEN basé sur la technique de BRET. Cet inhibiteur permet pour la première fois de suivre les changements de conformation de PTEN induits par différents stimuli, en temps réel et en cellules entières. Il a permis de mettre en évidence l'activation de PTEN par β -arrestine-2 et plusieurs RCPG. Nous avons démontré que cet outil peut être utilisé soit pour détecter des interactions PTEN/protéines, soit pour mesurer l'activité de PTEN, et en ce sens il pourrait être un précieux outil dans la recherche de nouveaux modulateurs de l'activité anti-oncogène de PTEN.

Ensemble, les résultats de cette thèse mettent en avant de nouveaux rôles non-canoniques pour les protéines arrestines et apportent de nouveaux outils qui permettront de poursuivre nos efforts pour une meilleure compréhension de ces mécanismes

Bibliographie

1. Shalaeva DN, Galperin MY, Mulkidjanian AY. Eukaryotic G protein-coupled receptors as descendants of prokaryotic sodium-translocating rhodopsins. *Biol Direct*. 2015;10:63.
2. Stoy H, Gurevich VV. How genetic errors in GPCRs affect their function: Possible therapeutic strategies. *Genes Dis*. 2015;2(2):108-32.
3. Caron MG, Srinivasan Y, Pitha J, Kociolek K, Lefkowitz RJ. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1979;254(8):2923-7.
4. Shorr RG, Lefkowitz RJ, Caron MG. Purification of the beta-adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. *J Biol Chem*. 1981;256(11):5820-6.
5. Benovic JL, Shorr RG, Caron MG, Lefkowitz RJ. The mammalian beta 2-adrenergic receptor: purification and characterization. *Biochemistry*. 1984;23(20):4510-8.
6. Lomasney JW, Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, Regan JW, DeBernardis JF, Caron MG, et al. Mammalian alpha 1-adrenergic receptor. Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J Biol Chem*. 1986;261(17):7710-6.
7. Regan JW, Nakata H, DeMarinis RM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Purification and characterization of the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1986;261(8):3894-900.
8. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 1986;321(6065):75-9.
9. Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Dixon RA, Keller P, et al. Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem*. 1987;262(15):7321-7.
10. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, et al. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science*. 1987;238(4827):650-6.
11. Pepitoni S, Wood IC, Buckley NJ. Structure of the m1 muscarinic acetylcholine receptor gene and its promoter. *J Biol Chem*. 1997;272(27):17112-7.

12. Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, et al. Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature*. 1990;347(6288):80-3.
13. Bouvier M, Hnatowich M, Collins S, Kobilka BK, Deblasi A, Lefkowitz RJ, et al. Expression of a human cDNA encoding the beta 2-adrenergic receptor in Chinese hamster fibroblasts (CHW): functionality and regulation of the expressed receptors. *Mol Pharmacol*. 1988;33(2):133-9.
14. Lefkowitz RJ. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(8):413-22.
15. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
17. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
18. Shonberg J, Kling RC, Gmeiner P, Lober S. GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(14):3880-906.
19. Zhang D, Zhao Q, Wu B. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol Cells*. 2015;38(10):836-42.
20. Shoichet BK, Kobilka BK. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(5):268-72.
21. Jacobson KA. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2015;98(4):541-55.
22. Stallaert W, Christopoulos A, Bouvier M. Ligand functional selectivity and quantitative pharmacology at G protein-coupled receptors. *Expert Opin Drug Discov*. 2011;6(8):811-25.
23. Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(3):198-210.
24. Hall MO, Bok D, Bacharach AD. Biosynthesis and assembly of the rod outer segment membrane system. Formation and fate of visual pigment in the frog retina. *J Mol Biol*. 1969;45(2):397-406.

25. Hargrave PA, McDowell JH, Curtis DR, Wang JK, Juszczak E, Fong SL, et al. The structure of bovine rhodopsin. *Biophys Struct Mech.* 1983;9(4):235-44.
26. Ovchinnikov Iu A, Abdulaev NG, Feigina M, Artamonov ID, Bogachuk AS. [Visual rhodopsin. III. Complete amino acid sequence and topography in a membrane]. *Bioorg Khim.* 1983;9(10):1331-40. Zritel'nyi rodopsin. III. Polnaia aminokislotnaia posledovatel'nost' i topografiia v membrane.
27. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000;289(5480):739-45.
28. Costanzi S, Siegel J, Tikhonova IG, Jacobson KA. Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 2009;15(35):3994-4002.
29. Carpenter EP, Beis K, Cameron AD, Iwata S. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(5):581-6.
30. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):794-807.
31. Deisenhofer J, Epp O, Miki K, Huber R, Michel H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature.* 1985;318(6047):618-24.
32. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* 2011;477(7366):549-55.
33. Ghosh E, Kumari P, Jaiman D, Shukla AK. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(2):69-81.
34. Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol.* 2003;10(12):980.
35. Peisley A, Skiniotis G. 2D Projection Analysis of GPCR Complexes by Negative Stain Electron Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2015;1335:29-38.
36. Westfield GH, Rasmussen SG, Su M, Dutta S, DeVree BT, Chung KY, et al. Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(38):16086-91.

37. Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang LY, Tripathi-Shukla P, et al. Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2014;512(7513):218-22.
38. O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J Biol Chem*. 1989;264(13):7564-9.
39. Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. 1994;2(1):1-7.
40. Munk C, Isberg V, Mordalski S, Harpsøe K, Rataj K, Hauser AS, et al. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. *Br J Pharmacol*. 2016;173(14):2195-207.
41. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999;18(7):1723-9.
42. Schiøth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 2005;142(1-2):94-101.
43. Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*. 2007;71(4):959-64.
44. Fritze O, Filipek S, Kuksa V, Palczewski K, Hofmann KP, Ernst OP. Role of the conserved NPxxY(x)₅6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2290-5.
45. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiøth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63(6):1256-72.
46. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185-94.
47. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79-94.
48. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*. 1991;252(5007):802-8.
49. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991;349(6305):117-27.

50. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*. 1994;369(6482):621-8.
51. Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*. 1977;252(20):6966-9.
52. Tobin AB. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S167-76.
53. Smith FD, Samelson BK, Scott JD. Discovery of cellular substrates for protein kinase A using a peptide array screening protocol. *Biochem J*. 2011;438(1):103-10.
54. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(7):651-62.
55. Hildebrandt JD, Sekura RD, Codina J, Iyengar R, Manclark CR, Birnbaumer L. Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature*. 1983;302(5910):706-9.
56. Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science*. 1993;261(5118):218-21.
57. Ridge KD, Abdulaev NG, Sousa M, Palczewski K. Phototransduction: crystal clear. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(9):479-87.
58. Sanematsu K, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y. Structure, function, and signaling of taste G-protein-coupled receptors. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;15(10):951-61.
59. Kinnamon SC. Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;204(2):158-68.
60. Morris AJ, Scarlata S. Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(4):429-35.
61. Siehler S. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;158(1):41-9.
62. Suzuki N, Hajicek N, Kozasa T. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals*. 2009;17(1):55-70.
63. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 1995;80(2):249-57.

64. Downes GB, Gautam N. The G protein subunit gene families. *Genomics*. 1999;62(3):544-52.
65. Smrcka AV. G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(14):2191-214.
66. Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):16077-82.
67. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(9):778-86.
68. Lambert NA. Dissociation of heterotrimeric g proteins in cells. *Sci Signal*. 2008;1(25):re5.
69. Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, Mase Y, Shimada I. NMR analyses of the Gbetagamma binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *J Biol Chem*. 2011;286(3):2215-23.
70. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*. 1987;325(6102):321-6.
71. De Waard M, Hering J, Weiss N, Feltz A. How do G proteins directly control neuronal Ca²⁺ channel function? *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(8):427-36.
72. Rozengurt E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol*. 1998;177(4):507-17.
73. Maier U, Babich A, Macrez N, Leopoldt D, Gierschik P, Illenberger D, et al. Gbeta 5gamma 2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13746-54.
74. Diel S, Klass K, Wittig B, Kleuss C. Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma. *J Biol Chem*. 2006;281(1):288-94.
75. Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, et al. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. 2013;504(7478):101-6.

76. Huang W, Manglik A, Venkatakrishnan AJ, Laeremans T, Feinberg EN, Sanborn AL, et al. Structural insights into micro-opioid receptor activation. *Nature*. 2015;524(7565):315-21.
77. Wilden U, Hall SW, Kuhn H. 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*. 1986;83(5):1174-8.
78. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*. 1990;248(4962):1547-50.
79. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:483-510.
80. Palmitessa A, Hess HA, Bany IA, Kim YM, Koelle MR, Benovic JL. *Caenorhabditis elegans* arrestin regulates neural G protein signaling and olfactory adaptation and recovery. *J Biol Chem*. 2005;280(26):24649-62.
81. Hyde DR, Mecklenburg KL, Pollock JA, Vihtelic TS, Benzer S. Twenty *Drosophila* visual system cDNA clones: one is a homolog of human arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(3):1008-12.
82. Dolph PJ, Ranganathan R, Colley NJ, Hardy RW, Socolich M, Zuker CS. Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. *Science*. 1993;260(5116):1910-6.
83. Roman G, He J, Davis RL. kurtz, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in *Drosophila*. *Genetics*. 2000;155(3):1281-95.
84. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 2001;53(1):1-24.
85. Renninger SL, Gesemann M, Neuhauss SC. Cone arrestin confers cone vision of high temporal resolution in zebrafish larvae. *Eur J Neurosci*. 2011;33(4):658-67.
86. Wilbanks AM, Fralish GB, Kirby ML, Barak LS, Li YX, Caron MG. Beta-arrestin 2 regulates zebrafish development through the hedgehog signaling pathway. *Science*. 2004;306(5705):2264-7.
87. Chen W, Ren XR, Nelson CD, Barak LS, Chen JK, Beachy PA, et al. Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science*. 2004;306(5705):2257-60.

88. Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christie M, Vatner SF, Seidman CE, et al. beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circ Res.* 1997;81(6):1021-6.
89. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science.* 1999;286(5449):2495-8.
90. Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1601-6.
91. Granzin J, Wilden U, Choe HW, Labahn J, Krafft B, Buldt G. X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature.* 1998;391(6670):918-21.
92. Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell.* 1999;97(2):257-69.
93. Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure.* 2001;9(9):869-80.
94. Kang DS, Kern RC, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Williams JC, Benovic JL. Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *J Biol Chem.* 2009;284(43):29860-72.
95. Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW. Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J Mol Biol.* 2011;406(3):467-78.
96. Sutton RB, Vishnivetskiy SA, Robert J, Hanson SM, Raman D, Knox BE, et al. Crystal structure of cone arrestin at 2.3Å: evolution of receptor specificity. *J Mol Biol.* 2005;354(5):1069-80.
97. Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV. An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41049-57.
98. Kovoov A, Celver J, Abdryashitov RI, Chavkin C, Gurevich VV. Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J Biol Chem.* 1999;274(11):6831-4.

99. Celver J, Vishnivetskiy SA, Chavkin C, Gurevich VV. Conservation of the phosphate-sensitive elements in the arrestin family of proteins. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9043-8.
100. Gray-Keller MP, Detwiler PB, Benovic JL, Gurevich VV. Arrestin with a single amino acid substitution quenches light-activated rhodopsin in a phosphorylation-independent fashion. *Biochemistry.* 1997;36(23):7058-63.
101. Hanson SM, Gurevich VV. The differential engagement of arrestin surface charges by the various functional forms of the receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3458-62.
102. Gurevich VV, Gurevich EV. Structural determinants of arrestin functions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;118:57-92.
103. Ostermaier MK, Schertler GF, Standfuss J. Molecular mechanism of phosphorylation-dependent arrestin activation. *Curr Opin Struct Biol.* 2014;29:143-51.
104. Park JY, Lee SY, Kim HR, Seo MD, Chung KY. Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: recent breakthroughs. *Arch Pharm Res.* 2016;39(3):293-301.
105. Nobles KN, Guan Z, Xiao K, Oas TG, Lefkowitz RJ. The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21370-81.
106. Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng WC, et al. Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature.* 2013;497(7447):137-41.
107. Kim YJ, Hofmann KP, Ernst OP, Scheerer P, Choe HW, Sommer ME. Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature.* 2013;497(7447):142-6.
108. Kang Y, Zhou XE, Gao X, He Y, Liu W, Ishchenko A, et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature.* 2015;523(7562):561-7.
109. Gurevich VV, Gurevich EV. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2006;110(3):465-502.
110. Kim M, Vishnivetskiy SA, Van Eps N, Alexander NS, Cleghorn WM, Zhan X, et al. Conformation of receptor-bound visual arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(45):18407-12.
111. Sommer ME, Hofmann KP, Heck M. Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. *Nat Commun.* 2012;3:995.

112. Ostermaier MK, Peterhans C, Jaussi R, Deupi X, Standfuss J. Functional map of arrestin-1 at single amino acid resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(5):1825-30.
113. Sinha A, Jones Brunette AM, Fay JF, Schafer CT, Farrens DL. Rhodopsin TM6 can interact with two separate and distinct sites on arrestin: evidence for structural plasticity and multiple docking modes in arrestin-rhodopsin binding. *Biochemistry*. 2014;53(20):3294-307.
114. Zhuo Y, Vishnivetskiy SA, Zhan X, Gurevich VV, Klug CS. Identification of receptor binding-induced conformational changes in non-visual arrestins. *J Biol Chem*. 2014;289(30):20991-1002.
115. Szczepek M, Beyriere F, Hofmann KP, Elgeti M, Kazmin R, Rose A, et al. Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. *Nat Commun*. 2014;5:4801.
116. Yun Y, Kim DK, Seo MD, Kim KM, Chung KY. Different conformational dynamics of beta-arrestin1 and beta-arrestin2 analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457(1):50-7.
117. Vishnivetskiy SA, Baameur F, Findley KR, Gurevich VV. Critical role of the central 139-loop in stability and binding selectivity of arrestin-1. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11741-50.
118. Snow BE, Hall RA, Krumins AM, Brothers GM, Bouchard D, Brothers CA, et al. GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17749-55.
119. Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem*. 1997;272(7):3871-4.
120. Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, Hollenberg MD. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(1):69-86.
121. Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal*. 2017.
122. Sibley DR, Peters JR, Nambi P, Caron MG, Lefkowitz RJ. Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. Beta-adrenergic receptor phosphorylation is correlated with attenuation of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem*. 1984;259(15):9742-9.

123. Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E, Nishimoto I. Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell*. 1991;67(4):723-30.
124. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997;390(6655):88-91.
125. Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem*. 2002;277(34):31249-56.
126. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A, Kobilka BK, et al. 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*. 1989;264(28):16786-92.
127. Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, et al. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*. 1988;333(6171):370-3.
128. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:653-92.
129. Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SS, Hester S, et al. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12316-24.
130. Stoffel RH, Randall RR, Premont RT, Lefkowitz RJ, Inglese J. Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J Biol Chem*. 1994;269(45):27791-4.
131. Gurevich VV, Benovic JL. Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J Biol Chem*. 1995;270(11):6010-6.
132. Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, et al. 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*. 1992;267(12):8558-64.

133. Vishnivetskiy SA, Raman D, Wei J, Kennedy MJ, Hurley JB, Gurevich VV. Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level. *J Biol Chem.* 2007;282(44):32075-83.
134. Gurevich VV, Dion SB, Onorato JJ, Ptasienski J, Kim CM, Sterne-Marr R, et al. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 1995;270(2):720-31.
135. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, et al. Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J Biol Chem.* 2011;286(13):11506-18.
136. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 2000;275(22):17201-10.
137. Mukherjee S, Gurevich VV, Preninger A, Hamm HE, Bader MF, Fazleabas AT, et al. Aspartic acid 564 in the third cytoplasmic loop of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor is crucial for phosphorylation-independent interaction with arrestin2. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17916-27.
138. Jala VR, Shao WH, Haribabu B. Phosphorylation-independent beta-arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4880-7.
139. Milasta S, Evans NA, Ormiston L, Wilson S, Lefkowitz RJ, Milligan G. The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem J.* 2005;387(Pt 3):573-84.
140. Stalheim L, Ding Y, Gullapalli A, Paing MM, Wolfe BL, Morris DR, et al. Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):78-87.
141. Galliera E, Jala VR, Trent JO, Bonecchi R, Signorelli P, Lefkowitz RJ, et al. beta-Arrestin-dependent constitutive internalization of the human chemokine decoy receptor D6. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25590-7.

142. Gurevich VV, Benovic JL. Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem.* 1993;268(16):11628-38.
143. Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(14):6201-4.
144. Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem.* 1989;264(21):12657-65.
145. Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* 1995;9(2):175-82.
146. Reiter E, Marion S, Robert F, Troispoux C, Boulay F, Guillou F, et al. Kinase-inactive G-protein-coupled receptor kinases are able to attenuate follicle-stimulating hormone-induced signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282(1):71-8.
147. Lembo PM, Ghahremani MH, Albert PR. Receptor selectivity of the cloned opossum G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in intact opossum kidney cells: role in desensitization of endogenous alpha2C-adrenergic but not serotonin 1B receptors. *Mol Endocrinol.* 1999;13(1):138-47.
148. Dicker F, Quitterer U, Winstel R, Honold K, Lohse MJ. Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5476-81.
149. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ. Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science.* 2005;310(5754):1686-90.
150. Dhami GK, Dale LB, Anborgh PH, O'Connor-Halligan KE, Sterne-Marr R, Ferguson SS. G Protein-coupled receptor kinase 2 regulator of G protein signaling homology domain binds to both metabotropic glutamate receptor 1a and Galphaq to attenuate signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16614-20.
151. Sallese M, Mariggio S, D'Urbano E, Iacovelli L, De Blasi A. Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol Pharmacol.* 2000;57(4):826-31.

152. Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 2003;22(15):3816-24.
153. Kimple AJ, Bosch DE, Giguere PM, Siderovski DP. Regulators of G-protein signaling and their Galpha substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol Rev.* 2011;63(3):728-49.
154. Dohlman HG, Apaniesk D, Chen Y, Song J, Nusskern D. Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1995;15(7):3635-43.
155. Kuhn H, Hall SW, Wilden U. Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 1984;176(2):473-8.
156. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, et al. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 1996;383(6599):447-50.
157. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):3712-7.
158. Zhuang T, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV, Sanders CR. Elucidation of inositol hexaphosphate and heparin interaction sites and conformational changes in arrestin-1 by solution nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* 2010;49(49):10473-85.
159. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(8):517-33.
160. Scarselli M, Donaldson JG. Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. *J Biol Chem.* 2009;284(6):3577-85.
161. Grampp T, Sauter K, Markovic B, Benke D. Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24157-65.
162. McDonald NA, Henstridge CM, Connolly CN, Irving AJ. An essential role for constitutive endocytosis, but not activity, in the axonal targeting of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 2007;71(4):976-84.

163. Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG. Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(1):93-8.
164. Schmid EM, Ford MG, Burtey A, Praefcke GJ, Peak-Chew SY, Mills IG, et al. Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol*. 2006;4(9):e262.
165. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*. 2000;275(30):23120-6.
166. Kim YM, Benovic JL. Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30760-8.
167. Peeler JS, Donzell WC, Anderson RG. The appendage domain of the AP-2 subunit is not required for assembly or invagination of clathrin-coated pits. *J Cell Biol*. 1993;120(1):47-54.
168. MBInfo contributors. Structure of clathrin and the clathrin-coated vesicle. In MBInfo Wiki, Retrieved 10/21/2014 from <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1396406556261/>.
169. Krupnick JG, Santini F, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32507-12.
170. Burtey A, Schmid EM, Ford MG, Rappoport JZ, Scott MG, Marullo S, et al. The conserved isoleucine-valine-phenylalanine motif couples activation state and endocytic functions of beta-arrestins. *Traffic*. 2007;8(7):914-31.
171. ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1096-100.
172. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem*. 1997;272(23):15017-22.
173. Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J*. 2002;363(Pt 3):657-66.

174. Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH. Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 1999;18(4):871-81.
175. Nelson CD, Kovacs JJ, Nobles KN, Whalen EJ, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I α promotes agonist-stimulated sequestration of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2008;283(30):21093-101.
176. Bhatnagar A, Willins DL, Gray JA, Woods J, Benovic JL, Roth BL. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT_{2A} receptors during endocytosis. *J Biol Chem.* 2001;276(11):8269-77.
177. Pals-Rylaarsdam R, Gurevich VV, Lee KB, Ptasienski JA, Benovic JL, Hosey MM. Internalization of the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem.* 1997;272(38):23682-9.
178. Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Benovic JL, Hosey MM. Arrestin-independent internalization of the m₁, m₃, and m₄ subtypes of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem.* 1998;273(21):12967-72.
179. Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA. Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(41):32037-45.
180. Paing MM, Johnston CA, Siderovski DP, Trejo J. Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3231-42.
181. Vines CM, Revankar CM, Maestas DC, LaRusch LL, Cimino DF, Kohout TA, et al. N-formyl peptide receptors internalize but do not recycle in the absence of arrestins. *J Biol Chem.* 2003;278(43):41581-4.
182. Fraile-Ramos A, Kohout TA, Waldhoer M, Marsh M. Endocytosis of the viral chemokine receptor US28 does not require beta-arrestins but is dependent on the clathrin-mediated pathway. *Traffic.* 2003;4(4):243-53.
183. Gray JA, Bhatnagar A, Gurevich VV, Roth BL. The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT_{2A} receptor induces agonist-independent internalization. *Mol Pharmacol.* 2003;63(5):961-72.

184. Goupil E, Wisheart V, Khoury E, Zimmerman B, Jaffal S, Hebert TE, et al. Biasing the prostaglandin F2alpha receptor responses toward EGFR-dependent transactivation of MAPK. *Mol Endocrinol.* 2012;26(7):1189-202.
185. Walker JK, Premont RT, Barak LS, Caron MG, Shetzline MA. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31515-23.
186. Chen Z, Gaudreau R, Le Gouill C, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Agonist-induced internalization of leukotriene B(4) receptor 1 requires G-protein-coupled receptor kinase 2 but not arrestins. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):377-86.
187. Dale LB, Bhattacharya M, Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS. Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Mol Pharmacol.* 2001;60(6):1243-53.
188. Rapoport I, Miyazaki M, Boll W, Duckworth B, Cantley LC, Shoelson S, et al. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J.* 1997;16(9):2240-50.
189. Honing S, Ricotta D, Krauss M, Spate K, Spolaore B, Motley A, et al. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell.* 2005;18(5):519-31.
190. Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K, Honing S. Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol.* 2002;156(5):791-5.
191. Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF. Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(18):13756-63.
192. Parent JL, Labrecque P, Driss Rochdi M, Benovic JL. Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7079-85.
193. Diviani D, Lattion AL, Abuin L, Staub O, Cotecchia S. The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 2003;278(21):19331-40.

194. Kelly BT, McCoy AJ, Spate K, Miller SE, Evans PR, Honing S, et al. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*. 2008;456(7224):976-79.
195. Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, Parton RG, Collins BM. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J Cell Sci*. 2015;128(7):1269-78.
196. Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17734-43.
197. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(24):11728-32.
198. Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 2000;275(9):6439-46.
199. Raposo G, Dunia I, Delavier-Klutchko C, Kaveri S, Strosberg AD, Benedetti EL. Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol*. 1989;50(2):340-52.
200. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem*. 1996;271(31):18302-5.
201. Werbonat Y, Kleutges N, Jakobs KH, van Koppen CJ. Essential role of dynamin in internalization of M2 muscarinic acetylcholine and angiotensin AT1A receptors. *J Biol Chem*. 2000;275(29):21969-74.
202. Delaney KA, Murph MM, Brown LM, Radhakrishna H. Transfer of M2 muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis. *J Biol Chem*. 2002;277(36):33439-46.
203. Roseberry AG, Hosey MM. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 4):739-46.

204. Kong MM, Hasbi A, Mattocks M, Fan T, O'Dowd BF, George SR. Regulation of D1 dopamine receptor trafficking and signaling by caveolin-1. *Mol Pharmacol.* 2007;72(5):1157-70.
205. Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol.* 2012;165(6):1717-36.
206. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1999;274(45):32248-57.
207. Innamorati G, Sadeghi HM, Tran NT, Birnbaumer M. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2222-6.
208. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:575-625.
209. Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell.* 1991;64(5):915-25.
210. McCaffrey MW, Bielli A, Cantalupo G, Mora S, Roberti V, Santillo M, et al. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):21-30.
211. Babbey CM, Ahktar N, Wang E, Chen CC, Grant BD, Dunn KW. Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2006;17(7):3156-75.
212. Proikas-Cezanne T, Gaugel A, Frickey T, Nordheim A. Rab14 is part of the early endosomal clathrin-coated TGN microdomain. *FEBS Lett.* 2006;580(22):5241-6.
213. Simpson JC, Griffiths G, Wessling-Resnick M, Fransen JA, Bennett H, Jones AT. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 26):6297-311.
214. Magadan JG, Barbieri MA, Mesa R, Stahl PD, Mayorga LS. Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Mol Cell Biol.* 2006;26(7):2595-614.
215. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(11):a022616.
216. Namkung Y, Le Gouill C, Lukashova V, Kobayashi H, Hogue M, Khoury E, et al. Monitoring G protein-coupled receptor and beta-arrestin trafficking in live cells using enhanced bystander BRET. *Nat Commun.* 2016;7:12178.

217. Tsvetanova NG, Irannejad R, von Zastrow M. G protein-coupled receptor (GPCR) signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J Biol Chem.* 2015;290(11):6689-96.
218. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 2009;458(7237):445-52.
219. Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, et al. Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science.* 2002;297(5581):615-20.
220. Temkin P, Lauffer B, Jager S, Cimermancic P, Krogan NJ, von Zastrow M. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol.* 2011;13(6):715-21.
221. Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell.* 2001;105(7):891-902.
222. Petaja-Repo UE, Hogue M, Laperriere A, Bhalla S, Walker P, Bouvier M. Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem.* 2001;276(6):4416-23.
223. Hislop JN, Henry AG, von Zastrow M. Ubiquitination in the first cytoplasmic loop of mu-opioid receptors reveals a hierarchical mechanism of lysosomal down-regulation. *J Biol Chem.* 2011;286(46):40193-204.
224. Liang W, Hoang Q, Clark RB, Fishman PH. Accelerated dephosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by mutation of the C-terminal lysines: effects on ubiquitination, intracellular trafficking, and degradation. *Biochemistry.* 2008;47(45):11750-62.
225. Marchese A, Benovic JL. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45509-12.
226. Wolfe BL, Marchese A, Trejo J. Ubiquitination differentially regulates clathrin-dependent internalization of protease-activated receptor-1. *J Cell Biol.* 2007;177(5):905-16.
227. Dores MR, Trejo J. Ubiquitination of G protein-coupled receptors: functional implications and drug discovery. *Mol Pharmacol.* 2012;82(4):563-70.
228. Hicke L, Riezman H. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell.* 1996;84(2):277-87.

229. Roth AF, Davis NG. Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol.* 1996;134(3):661-74.
230. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):394-8.
231. Alonso V, Friedman PA. Minireview: ubiquitination-regulated G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *Mol Endocrinol.* 2013;27(4):558-72.
232. Marchese A, Raiborg C, Santini F, Keen JH, Stenmark H, Benovic JL. The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Dev Cell.* 2003;5(5):709-22.
233. Slagsvold T, Marchese A, Brech A, Stenmark H. CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *EMBO J.* 2006;25(16):3738-49.
234. Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S, Sundquist WI. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature.* 2007;449(7163):740-4.
235. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 2001;294(5545):1307-13.
236. Shenoy SK, Xiao K, Venkataramanan V, Snyder PM, Freedman NJ, Weissman AM. Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2008;283(32):22166-76.
237. Tanowitz M, Von Zastrow M. Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50219-22.
238. Puthenveedu MA, Lauffer B, Temkin P, Vistein R, Carlton P, Thorn K, et al. Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell.* 2010;143(5):761-73.
239. Bornert O, Moller TC, Boeuf J, Candusso MP, Wagner R, Martinez KL, et al. Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One.* 2013;8(2):e56336.
240. Simonin F, Karcher P, Boeuf JJ, Matifas A, Kieffer BL. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem.* 2004;89(3):766-75.

241. Heydorn A, Sondergaard BP, Ersboll B, Holst B, Nielsen FC, Haft CR, et al. A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem.* 2004;279(52):54291-303.
242. McGarvey JC, Xiao K, Bowman SL, Mamonova T, Zhang Q, Bisello A, et al. Actin-Sorting Nexin 27 (SNX27)-Retromer Complex Mediates Rapid Parathyroid Hormone Receptor Recycling. *J Biol Chem.* 2016;291(21):10986-1002.
243. Gage RM, Matveeva EA, Whiteheart SW, von Zastrow M. Type I PDZ ligands are sufficient to promote rapid recycling of G Protein-coupled receptors independent of binding to N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Biol Chem.* 2005;280(5):3305-13.
244. Bowman SL, Puthenveedu MA. Postendocytic Sorting of Adrenergic and Opioid Receptors: New Mechanisms and Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;132:189-206.
245. Pavlos NJ, Friedman PA. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(3):213-26.
246. Hicke L, Zanolari B, Riezman H. Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol.* 1998;141(2):349-58.
247. Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS. beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27221-8.
248. Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol.* 1995;47(4):666-76.
249. Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB, Knoll BJ. Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol.* 2006;147(3):249-59.
250. Ghosh M, Schonbrunn A. Differential temporal and spatial regulation of somatostatin receptor phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13561-73.
251. Hinkle PM, Gehret AU, Jones BW. Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front Neurosci.* 2012;6:180.

252. Berthouze M, Venkataramanan V, Li Y, Shenoy SK. The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate beta2 adrenergic receptor recycling and resensitization. *EMBO J*. 2009;28(12):1684-96.
253. Lahaie N, Kralikova M, Prezeau L, Blahos J, Bouvier M. Post-endocytotic Deubiquitination and Degradation of the Metabotropic gamma-Aminobutyric Acid Receptor by the Ubiquitin-specific Protease 14. *J Biol Chem*. 2016;291(13):7156-70.
254. Milojevic T, Reiterer V, Stefan E, Korkhov VM, Dorostkar MM, Ducza E, et al. The ubiquitin-specific protease Usp4 regulates the cell surface level of the A2A receptor. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1083-94.
255. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 2010;428(2):133-45.
256. Li Q, Muma NA. Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT(1)A receptor: characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT(1)A receptors. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(11):2542-53.
257. Gowran A, Murphy CE, Campbell VA. Delta(9)-tetrahydrocannabinol regulates the p53 post-translational modifiers Murine double minute 2 and the Small Ubiquitin MOdifier protein in the rat brain. *FEBS Lett*. 2009;583(21):3412-8.
258. Tang Z, El Far O, Betz H, Scheschonka A. Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor 8. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38153-9.
259. Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808(12):2981-94.
260. Omary MB, Trowbridge IS. Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured human cells. *J Biol Chem*. 1981;256(10):4715-8.
261. O'Brien PJ, Zatz M. Acylation of bovine rhodopsin by [3H]palmitic acid. *J Biol Chem*. 1984;259(8):5054-7.
262. Moench SJ, Moreland J, Stewart DH, Dewey TG. Fluorescence studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin. *Biochemistry*. 1994;33(19):5791-6.
263. Hawtin SR, Tobin AB, Patel S, Wheatley M. Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem*. 2001;276(41):38139-46.

264. Charest PG, Bouvier M. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41541-51.
265. Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, et al. Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem.* 1997;272(49):31051-7.
266. Lin FT, Chen W, Shenoy S, Cong M, Exum ST, Lefkowitz RJ. Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry.* 2002;41(34):10692-9.
267. Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 1999;274(23):15971-4.
268. Kim YM, Barak LS, Caron MG, Benovic JL. Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16837-46.
269. Shenoy SK, Barak LS, Xiao K, Ahn S, Berthouze M, Shukla AK, et al. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem.* 2007;282(40):29549-62.
270. Perroy J, Pontier S, Charest PG, Aubry M, Bouvier M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods.* 2004;1(3):203-8.
271. Wyatt D, Malik R, Vesecky AC, Marchese A. Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *J Biol Chem.* 2011;286(5):3884-93.
272. Gould N, Doulias PT, Tenopoulou M, Raju K, Ischiropoulos H. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem.* 2013;288(37):26473-9.
273. Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, et al. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell.* 2008;31(3):395-405.
274. Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, et al. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell.* 2007;129(3):511-22.
275. Wang G, Moniri NH, Ozawa K, Stamler JS, Daaka Y. Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1295-300.

276. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*. 1999;283(5402):655-61.
277. Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK, et al. Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12011-6.
278. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005;308(5721):512-7.
279. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol Cell*. 2006;24(5):643-52.
280. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, et al. 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*. 2003;100(20):11406-11.
281. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta - arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11086-91.
282. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004;23(48):7957-68.
283. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 2000;19(49):5636-42.
284. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004;23(48):7906-9.
285. Cleghorn WM, Branch KM, Kook S, Arnette C, Bulus N, Zent R, et al. Arrestins regulate cell spreading and motility via focal adhesion dynamics. *Mol Biol Cell*. 2015;26(4):622-35.
286. Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9429-36.
287. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2449-54.

288. Song X, Coffa S, Fu H, Gurevich VV. How does arrestin assemble MAPKs into a signaling complex? *J Biol Chem.* 2009;284(1):685-95.
289. Bourquard T, Landomiel F, Reiter E, Crepieux P, Ritchie DW, Aze J, et al. Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/beta-arrestin/Erk module complex. *Sci Rep.* 2015;5:10760.
290. Hanson SM, Cleghorn WM, Francis DJ, Vishnivetskiy SA, Raman D, Song X, et al. Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J Mol Biol.* 2007;368(2):375-87.
291. Coffa S, Breitman M, Hanson SM, Callaway K, Kook S, Dalby KN, et al. The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS One.* 2011;6(12):e28723.
292. Jafri F, El-Shewy HM, Lee MH, Kelly M, Luttrell DK, Luttrell LM. Constitutive ERK1/2 activation by a chimeric neurokinin 1 receptor-beta-arrestin1 fusion protein. Probing the composition and function of the G protein-coupled receptor "signalsome". *J Biol Chem.* 2006;281(28):19346-57.
293. Belcheva MM, Coscia CJ. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals.* 2002;11(1):34-44.
294. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10782-7.
295. Ahn S, Shenoy SK, Wei H, Lefkowitz RJ. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* 2004;279(34):35518-25.
296. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 2000;148(6):1267-81.
297. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, et al. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6258-67.
298. Elorza A, Penela P, Sarnago S, Mayor F, Jr. MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* 2003;278(31):29164-73.

299. Pitcher JA, Tesmer JJ, Freeman JL, Capel WD, Stone WC, Lefkowitz RJ. Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34531-4.
300. Miki H, Fukuda M, Nishida E, Takenawa T. Phosphorylation of WAVE downstream of mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(39):27605-9.
301. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 1997;137(2):481-92.
302. Hughes PE, Oertli B, Hansen M, Chou FL, Willumsen BM, Ginsberg MH. Suppression of integrin activation by activated Ras or Raf does not correlate with bulk activation of ERK MAP kinase. *Mol Biol Cell.* 2002;13(7):2256-65.
303. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7478-83.
304. Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K. A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34418-26.
305. Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem.* 2004;279(53):55419-24.
306. Aplin M, Christensen GL, Schneider M, Heydorn A, Gammeltoft S, Kjolbye AL, et al. Differential extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation by the angiotensin type 1 receptor supports distinct phenotypes of cardiac myocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;100(5):296-301.
307. Seta K, Nanamori M, Modrall JG, Neubig RR, Sadoshima J. AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9268-77.
308. DeWire SM, Kim J, Whalen EJ, Ahn S, Chen M, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10611-20.
309. Strachan RT, Allen JA, Sheffler DJ, Roth BL. p90 Ribosomal S6 kinase 2, a novel GPCR kinase, is required for growth factor-mediated attenuation of GPCR signaling. *Biochemistry.* 2010;49(12):2657-71.

310. Song X, Raman D, Gurevich EV, Vishnivetskiy SA, Gurevich VV. Visual and both non-visual arrestins in their "inactive" conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21491-9.
311. Seo J, Tsakem EL, Breitman M, Gurevich VV. Identification of arrestin-3-specific residues necessary for JNK3 kinase activation. *J Biol Chem*. 2011;286(32):27894-901.
312. Miller WE, McDonald PH, Cai SF, Field ME, Davis RJ, Lefkowitz RJ. Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta -arrestin2 responsible for activation of JNK3. *J Biol Chem*. 2001;276(30):27770-7.
313. McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, et al. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*. 2000;290(5496):1574-7.
314. Zhan X, Kaoud TS, Dalby KN, Gurevich VV. Nonvisual arrestins function as simple scaffolds assembling the MKK4-JNK3alpha2 signaling complex. *Biochemistry*. 2011;50(48):10520-9.
315. Breitman M, Kook S, Gimenez LE, Lizama BN, Palazzo MC, Gurevich EV, et al. Silent scaffolds: inhibition OF c-Jun N-terminal kinase 3 activity in cell by dominant-negative arrestin-3 mutant. *J Biol Chem*. 2012;287(23):19653-64.
316. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239-52.
317. Kook S, Zhan X, Kaoud TS, Dalby KN, Gurevich VV, Gurevich EV. Arrestin-3 binds c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and JNK2 and facilitates the activation of these ubiquitous JNK isoforms in cells via scaffolding. *J Biol Chem*. 2013;288(52):37332-42.
318. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-9.
319. Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, et al. JNK3 perpetuates metabolic stress induced by Abeta peptides. *Neuron*. 2012;75(5):824-37.
320. Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, et al. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(2):665-70.

321. Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, et al. Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):864-71.
322. Zhan X, Kook S, Gurevich EV, Gurevich VV. Arrestin-dependent activation of JNK family kinases. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;219:259-80.
323. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene.* 2003;22(56):8983-98.
324. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol.* 2008;28(12):4104-15.
325. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):283-96.
326. Leslie NR, Downes CP. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J.* 2004;382(Pt 1):1-11.
327. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* 1997;16(1):64-7.
328. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004;6(2):117-27.
329. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* 2000;20(14):5010-8.
330. Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7491-6.
331. Rahdar M, Inoue T, Meyer T, Zhang J, Vazquez F, Devreotes PN. A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(2):480-5.
332. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, et al. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol.* 2005;7(4):399-404.
333. Lu Y, Yu Q, Liu JH, Zhang J, Wang H, Koul D, et al. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40057-66.

334. Lodeiro M, Theodoropoulou M, Pardo M, Casanueva FF, Camina JP. c-Src regulates Akt signaling in response to ghrelin via beta-arrestin signaling-independent and -dependent mechanisms. *PLoS One*. 2009;4(3):e4686.
335. Goel R, Phillips-Mason PJ, Raben DM, Baldassare JJ. alpha-Thrombin induces rapid and sustained Akt phosphorylation by beta-arrestin1-dependent and -independent mechanisms, and only the sustained Akt phosphorylation is essential for G1 phase progression. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18640-8.
336. Luan B, Zhao J, Wu H, Duan B, Shu G, Wang X, et al. Deficiency of a beta-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. *Nature*. 2009;457(7233):1146-9.
337. Wang P, Kumar P, Wang C, Defea KA. Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 alpha and beta by protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. *Biochem J*. 2007;408(2):221-30.
338. Christensen GL, Kelstrup CD, Lyngso C, Sarwar U, Bogebo R, Sheikh SP, et al. Quantitative phosphoproteomics dissection of seven-transmembrane receptor signaling using full and biased agonists. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(7):1540-53.
339. Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*. 2005;122(2):261-73.
340. Palmitessa A, Benovic JL. Arrestin and the multi-PDZ domain-containing protein MPZ-1 interact with phosphatase and tensin homolog (PTEN) and regulate *Caenorhabditis elegans* longevity. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15187-200.
341. Lima-Fernandes E, Enslen H, Camand E, Kotelevets L, Boullaran C, Achour L, et al. Distinct functional outputs of PTEN signalling are controlled by dynamic association with beta-arrestins. *EMBO J*. 2011;30(13):2557-68.
342. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*. 1996;84(6):853-62.
343. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:443-68.
344. Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, et al. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- κ B pathways. *Mol Cell*. 2004;14(3):303-17.

345. Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(23):8603-7.
346. Scott MG, Le Rouzic E, Perianin A, Pierotti V, Enslen H, Benichou S, et al. Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37693-701.
347. Hoepfner CZ, Cheng N, Ye RD. Identification of a nuclear localization sequence in beta-arrestin-1 and its functional implications. *J Biol Chem*. 2012;287(12):8932-43.
348. Ma L, Pei G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 2):213-8.
349. Boularan C, Scott MG, Bourougaa K, Bellal M, Esteve E, Thuret A, et al. beta-arrestin 2 oligomerization controls the Mdm2-dependent inhibition of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(46):18061-6.
350. Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*. 2005;123(5):833-47.
351. Neuhaus EM, Mashukova A, Barbour J, Wolters D, Hatt H. Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 15):3047-56.
352. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, et al. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol*. 2009;7(8):e1000172.
353. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, et al. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol*. 2011;7(5):278-84.
354. Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Jr., et al. Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem*. 2013;288(39):27849-60.
355. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*. 2009;5(10):734-42.

356. Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature*. 2013;495(7442):534-8.
357. Mullershausen F, Zecri F, Cetin C, Billich A, Guerini D, Seuwen K. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol*. 2009;5(6):428-34.
358. Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga JP. Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gbetagamma complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1530-5.
359. Gidon A, Al-Bataineh MM, Jean-Alphonse FG, Stevenson HP, Watanabe T, Louet C, et al. Endosomal GPCR signaling turned off by negative feedback actions of PKA and v-ATPase. *Nat Chem Biol*. 2014;10(9):707-9.
360. Kuna RS, Girada SB, Asalla S, Vallentyne J, Maddika S, Patterson JT, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated endosomal cAMP generation promotes glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(2):E161-70.
361. Merriam LA, Baran CN, Girard BM, Hardwick JC, May V, Parsons RL. Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *J Neurosci*. 2013;33(10):4614-22.
362. Inda C, Dos Santos Claro PA, Bonfiglio JJ, Senin SA, Maccarrone G, Turck CW, et al. Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRHR1 signaling. *J Cell Biol*. 2016;214(2):181-95.
363. Kotowski SJ, Hopf FW, Seif T, Bonci A, von Zastrow M. Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron*. 2011;71(2):278-90.
364. Neumann S, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Gershengorn MC. Persistent cAMP signaling by thyrotropin (TSH) receptors is not dependent on internalization. *FASEB J*. 2010;24(10):3992-9.
365. Thomsen AR, Plouffe B, Cahill TJ, 3rd, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, et al. GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*. 2016;166(4):907-19.

366. Cahill TJ, 3rd, Thomsen AR, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, et al. Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(10):2562-7.
367. Kumari P, Srivastava A, Ghosh E, Ranjan R, Dogra S, Yadav PN, et al. Core engagement with beta-arrestin is dispensable for agonist induced vasopressin receptor endocytosis and ERK activation. *Mol Biol Cell*. 2017.
368. Attar N, Cullen PJ. The retromer complex. *Adv Enzyme Regul*. 2010;50(1):216-36.
369. Wassmer T, Attar N, Harterink M, van Weering JR, Traer CJ, Oakley J, et al. The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Dev Cell*. 2009;17(1):110-22.
370. Eaton S. Retromer retrieves wntless. *Dev Cell*. 2008;14(1):4-6.
371. Fjorback AW, Seaman M, Gustafsen C, Mehmedbasic A, Gokool S, Wu C, et al. Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *J Neurosci*. 2012;32(4):1467-80.
372. Shi H, Rojas R, Bonifacino JS, Hurley JH. The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(6):540-8.
373. Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1442-7.
374. Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ. 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*. 2005;102(5):1448-53.
375. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7805-17.
376. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, et al. Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci Signal*. 2011;4(185):ra51.
377. Neumann-Staubitz P, Neumann H. The use of unnatural amino acids to study and engineer protein function. *Curr Opin Struct Biol*. 2016;38:119-28.

378. Barthelet G, Carrat G, Cassier E, Barker B, Gaven F, Pillot M, et al. Beta-arrestin1 phosphorylation by GRK5 regulates G protein-independent 5-HT₄ receptor signalling. *EMBO J.* 2009;28(18):2706-18.
379. Marion S, Fralish GB, Laporte S, Caron MG, Barak LS. N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the beta-arrestins. *J Biol Chem.* 2007;282(26):18937-44.
380. Xiao K, Sun J, Kim J, Rajagopal S, Zhai B, Villen J, et al. Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15299-304.
381. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* 1997;139(3):651-64.
382. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211-25.
383. Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 2001;11(12):504-11.
384. Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, De Marinis M, Tafuri D, Cinelli M, et al. Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):19700-28.
385. Lin FT, Daaka Y, Lefkowitz RJ. beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem.* 1998;273(48):31640-3.
386. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, et al. beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2479-85.
387. van Koppen CJ, Jakobs KH. Arrestin-independent internalization of G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol.* 2004;66(3):365-7.
388. Alvarez-Curto E, Inoue A, Jenkins L, Raihan SZ, Prihandoko R, Tobin AB, et al. Targeted Elimination of G Proteins and Arrestins Defines Their Specific Contributions to Both Intensity and Duration of G Protein-coupled Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(53):27147-59.

389. Urs NM, Jones KT, Salo PD, Severin JE, Trejo J, Radhakrishna H. A requirement for membrane cholesterol in the beta-arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA1 lysophosphatidic acid receptors. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 22):5291-304.
390. Ahn S, Nelson CD, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. Desensitization, internalization, and signaling functions of beta-arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1740-4.
391. Barak LS, Bai Y, Snyder JC, Wang J, Chen W, Caron MG. Triphenylmethane dye activation of beta-arrestin. *Biochemistry.* 2013;52(32):5403-14.
392. Zhou XE, Gao X, Barty A, Kang Y, He Y, Liu W, et al. X-ray laser diffraction for structure determination of the rhodopsin-arrestin complex. *Sci Data.* 2016;3:160021.
393. Granzin J, Stadler A, Cousin A, Schlesinger R, Batra-Safferling R. Structural evidence for the role of polar core residue Arg175 in arrestin activation. *Sci Rep.* 2015;5:15808.
394. Granzin J, Cousin A, Weirauch M, Schlesinger R, Buldt G, Batra-Safferling R. Crystal structure of p44, a constitutively active splice variant of visual arrestin. *J Mol Biol.* 2012;416(5):611-8.
395. Milano SK, Pace HC, Kim YM, Brenner C, Benovic JL. Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry.* 2002;41(10):3321-8.
396. Milano SK, Kim YM, Stefano FP, Benovic JL, Brenner C. Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9812-23.
397. Arkin MR, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):301-17.