

2M11.2646.8

Université de Montréal

Identification de la séquence d'un gène codant pour un récepteur à la sérotonine chez le
mollusque *Aplysia californica*

par

Christelle Bouchard

Département des sciences biologiques de la faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M. Sc)

en sciences biologiques

Décembre, 1997

© Christelle Bouchard, 1997



Université de Montréal

QH
302
U57
1998
V.012

Il est permis de reproduire ce document en totalité ou en partie à condition de mentionner la source de la référence.

Université de Montréal

1998

Christine Bédard

Éprouvée par les services de la bibliothèque de la Faculté des arts et des sciences

Mention présentée à la Faculté des arts et des sciences

en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en sciences (M. Sc.)

en sciences technologiques

Document 1000

© Université de Montréal 1998



Faculté des études supérieures

Ce mémoire de maîtrise intitulé:

" Identification de la séquence d'un gène codant pour un récepteur à la sérotonine chez le mollusque *Aplysia californica*"

présenté par

Christelle Bouchard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Thérèse Cabana (Présidente du jury)

Dr. Michel Anctil (Directeur de recherche)

Dr. Michel Bouvier (Codirecteur)

Dr. David Morse (Membre du jury)

mémoire accepté le 01.09.1998

À mon ami Gilles Houle

Sommaire

La fonction sérotoninergique chez l'aplysie fait l'objet de nombreuses études et l'intérêt qu'on lui porte s'adresse en particulier aux mécanismes de neuromodulation et de neurotransmission. Pour bien comprendre les aspects moléculaires et cellulaires à la base de ces mécanismes, la connaissance de la structure des récepteurs des neurotransmetteurs est un atout. Chez l'aplysie, seulement 2 récepteurs à la sérotonine ont été clonés. La voie de transduction qu'ils utilisent passe par l'activation d'une phospholipase C. On sait cependant qu'il existe chez l'aplysie d'autres types de récepteurs à la sérotonine dont certains fonctionnent en activant une adényl-cyclase. Ce travail présente la séquence d'un troisième récepteur à la sérotonine cloné chez l'aplysie. L'ADNc codant pour ce récepteur provient d'une banque de rein du gastéropode *Aplysia californica*. L'analyse de similarité de séquences effectuée à l'aide de BLAST suggère que ce gène code pour un récepteur à la sérotonine de type 5-HT₁. Le profil d'hydrophilicité obtenu pour le récepteur montre qu'il possède les sept segments transmembranaires propres à la famille des récepteurs couplés à la protéine G. De plus, la séquence primaire de ce récepteur est constituée de nombreux résidus et motifs connus pour jouer des rôles importants dans les fonctions de liaison au ligand et de régulation de l'activité réceptorielle. La conservation du site de liaison du récepteur de l'aplysie pour la sérotonine est remarquable. Un modèle de ce site développé par Hibert (1991) pour un récepteur de rat montre qu'à peu de choses près le récepteur de l'aplysie s'y conforme. L'élucidation de la séquence primaire de récepteur chez l'aplysie ne sert pas seulement la recherche en neurobiologie mais elle contribue aussi à mieux comprendre l'évolution des récepteurs couplés à la protéine G au cours de ses 750 millions d'années d'existence dans le règne animal.

Table des Matières

Sommaire.....	III
Table des matières.....	IV
Liste des figures.....	VIII

1. INTRODUCTION

1.1 La fonction sérotoninergique chez l'aplysie.....	2
1.2 Les récepteurs à la sérotonine clonés chez les invertébrés.....	6
1.2.1 Les récepteurs à la sérotonine 5-HTdro-1, 5-HTdro2A, 5-HTdro2B et 5-HT-2Dro chez la mouche.....	7
1.2.2 Le récepteur à la sérotonine (clone #18) de la barnacle.....	8
1.2.3 Les récepteurs à la sérotonine 5-HT _{LYM} et 5-HT _{2LYM} chez le .. mollusque <i>L. stagnalis</i>	8
1.2.4 Les récepteurs à la sérotonine Ap5-HT-B1 et Ap5-HT-B2 chez l'aplysie.....	9
1.2.5 Le récepteur à la sérotonine 5-HT-Ce du nématode <i>C. elegans</i>	10
1.3 Évolution: le point de vue des moléculaires.....	11
1.3.1 Le problème de la phylogénie des mollusques.....	11
1.3.2 L'antiquité des récepteurs sérotoninergiques.....	12

1.4.1 La diversité des récepteurs sérotoninergiques.....	14
1.4.2 Les voies de transduction empruntées par les récepteurs à la sérotonine.....	15
1.4.3 Le complexe récepteur/protéine G/effecteur.....	16
1.5 La régulation du récepteur.....	19
1.5.1 La désensibilisation.....	20
1.5.2 La séquestration.....	25
1.5.3 La palmitoylation.....	26
1.6 La structure des récepteurs couplés à la protéine G.....	27
1.6.1 Le site de reconnaissance du récepteur.....	27
1.6.2 Le modèle de Hibert.....	29
1.6.3 Les sites de liaisons à la protéine G: la troisième boucle intracellulaire.....	31
1.6.4 Le motif DRY: la deuxième boucle intracellulaire.....	34
1.6.5 Le lien disulfure intramoléculaire.....	35
1.6.6 Les sites de glycosylation.....	35

2. MATÉRIEL et MÉTHODE

2.1.1 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	37
2.1.2 La construction d'ADN recombinant.....	39
2.1.3 Le clonage des ADN recombinants.....	40
2.1.4 La sélection de l'ADN recombinant.....	41
2.2 Le projet: Travaux préliminaires.....	42
2.2.1 Le fractionnement de la banque.....	44
2.2.2 Le criblage des échantillons au moyen de la réaction PCR.....	46
2.2.3 L'isolation du recombinant recherché.....	46
2.2.4 Le clonage de l'insert sélectionné.....	48
2.2.5 Le séquençage de l'insert.....	49
2.2.6 Second criblage de la banque avec le fragment G4 marqué.....	51

3. RÉSULTATS et DISCUSSION

3.1.1 L'identification de la nouvelle séquence de l'aplysie.....	52
3.1.2 Hydrophatie de la séquence APL5-HT.....	54
3.1.3 Le modèle de Hibert et le récepteur APL5-HT.....	61
3.1.4 Le motif DRY du récepteur APL5-HT.....	62
3.1.5 Le motif NPXXY du récepteur APL5-HT.....	63
3.1.6 Le motif BBXB/BBXXB du récepteur APL5-HT.....	64

3.2 Les modifications post-traductionnelles	
3.2.1 La cystéine 475 du récepteur APL5-HT.....	65
3.2.2 Les liens disulfures du récepteur APL5-HT.....	65
3.2.3 Les sites de glycosylation chez le récepteur APL5-HT.....	66
3.2.4 Les sites de phosphorylation.....	66
4. CONCLUSION.....	66
5. BIBLIOGRAPHIE.....	68

LISTE des FIGURES

Figure 1	3
Aspect général de l'aplysie (<i>A. californica</i>).	
Figure 2	18
Représentation schématique des 2 voies de transduction principales empruntées par les récepteurs sérotoninergiques.	
Figure 3	22
Modèle de régulation concertée de la palmitoylation et de la phosphorylation du récepteur β 2-adrénérique.	
Figure 4	30
Le modèle de Hibert.	
Figure 5	33
Séquence-type d'un récepteur couplé à la protéine G.	
Figure 6	38
Description schématisée de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).	
Figure 7	43
Criblage de plages recombinantes par hybridation avec une sonde spécifique marquée	
Figure 8	45
Fractionnement de la banque et criblage par PCR.	
Figure 9	47
Procédure de séparation, de marquage et de révélation des produits d'amplification PCR.	
Figure 10	50
Stratégie adoptée pour séquencer le gène APL5-HT.	
Figure 11	55
Séquence du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie déduite à partir de sa séquence en acides nucléiques.	
Figure 12	56
Alignement de la séquence primaire du récepteur à la sérotonine APL5-HT avec celles de récepteurs homologues.	

Figure 13	58
Profil d'hydrophilicité du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie.	
Figure 14	60
Séquence primaire du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie.	

1. INTRODUCTION

Les récepteurs des neurotransmetteurs et des hormones sont aussi des récepteurs de médicaments. Voilà la motivation principale qui conduit à cloner la centaine de récepteurs couplés à la protéine G maintenant connus chez les vertébrés supérieurs. Chez les invertébrés, l'élucidation de la structure primaire des récepteurs répond autant à des intérêts d'ordre pratique (ex. contrôle de la prolifération d'une espèce) qu'au désir de mieux comprendre l'organisation du vivant. Le petit nombre de récepteurs clonés chez les invertébrés permet déjà de dresser un tableau sommaire sur l'origine lointaine du système récepteuriel et sa conservation dans le règne animal. Toutefois, c'est la compréhension des aspects cellulaires et moléculaires sous-jacents au fonctionnement d'un système physiologique donné qui est le plus souvent derrière l'intention d'élucider la structure d'un récepteur. La complexité des systèmes vertébrés rend souvent inabordable l'étude de leur fonctionnement. Les modèles physiologiques rudimentaires des invertébrés offrent donc une alternative de choix. La simplicité du système nerveux de l'aplysie en fait un animal privilégié pour l'étude des mécanismes fondamentaux concernant la genèse de l'influx nerveux et la transmission synaptique. L'étude de ces propriétés cellulaires a tant apporté à notre compréhension de la modulation neuronale et de ses relations avec le comportement que l'aplysie est devenu le cobaye des neurobiologistes. La présente étude porte sur le clonage d'un nouveau gène codant pour un récepteur à la sérotonine chez l'aplysie. De nombreuses fonctions physiologiques sont modulées par la sérotonine chez ce mollusque et la connaissance de toute nouvelle structure de récepteur pouvant être impliquée dans ces fonctions permet d'approfondir les connaissances déjà acquises de ces systèmes.

1.1 La fonction sérotoninergique chez l'aplysie

L'aplysie est un mollusque qui mesure une quinzaine de centimètre que l'on retrouve sur les fonds océaniques peu profonds (figure 1). Elle possède un petit répertoire de comportements stéréotypés dont la simplicité a permis leur compréhension au niveau cellulaire et moléculaire. Le petit nombre de neurones qui constitue le système nerveux de l'aplysie (vingt mille neurones disposées en des réseaux simples), la bonne survie des préparations isolées et la grande taille des structures unitaires (le soma nerveux peut dépasser le millimètre chez l'aplysie) sont les principaux facteurs grâce auxquels on a pu mettre en évidence les relations qui existent entre les fonctions d'une cellule et le comportement. La sérotonine (5-HT) participe à plusieurs fonctions de neuromodulation et de neurotransmission chez l'aplysie. L'expression précoce de ce neurotransmetteur chez l'embryon suggère qu'il joue un rôle central dans le processus du développement. Dès le cinquième jour de l'embryogénèse, avant même la période larvaire, 3 cellules sérotoninergiques font leur apparition dans la région antérieure de l'animal (Marois et Carew, 1997). La présence du neurotransmetteur est concomitante à l'expression de ses récepteurs. Les travaux en électrophysiologie ont tôt fait de démontrer l'existence d'une diversité de récepteurs au sein du système nerveux des mollusques. Chez l'aplysie par exemple, la sérotonine et ses analogues déclenchent des réponses physiologiques variées qui suggèrent la présence d'au moins 5 types différents de récepteurs (Gerschenfeld et Paupardin-Tritsch, 1974). Les études de radioliation ont montré que ces récepteurs sont avant tout exprimés dans le système nerveux mais leur présence est aussi constatée dans les tissus périphériques (Kadan et Hartig, 1988). Le coeur de l'aplysie entre autres répond à la sérotonine synthétisée par un motoneurone cardiaque (RB_{HE}) du ganglion abdominal. Des concentrations en 5-HT de l'ordre du nanomolaire suffisent pour augmenter le rythme cardiaque ainsi que la synthèse d'AMPC dans ce tissu (Liebeswar *et al.*, 1975).

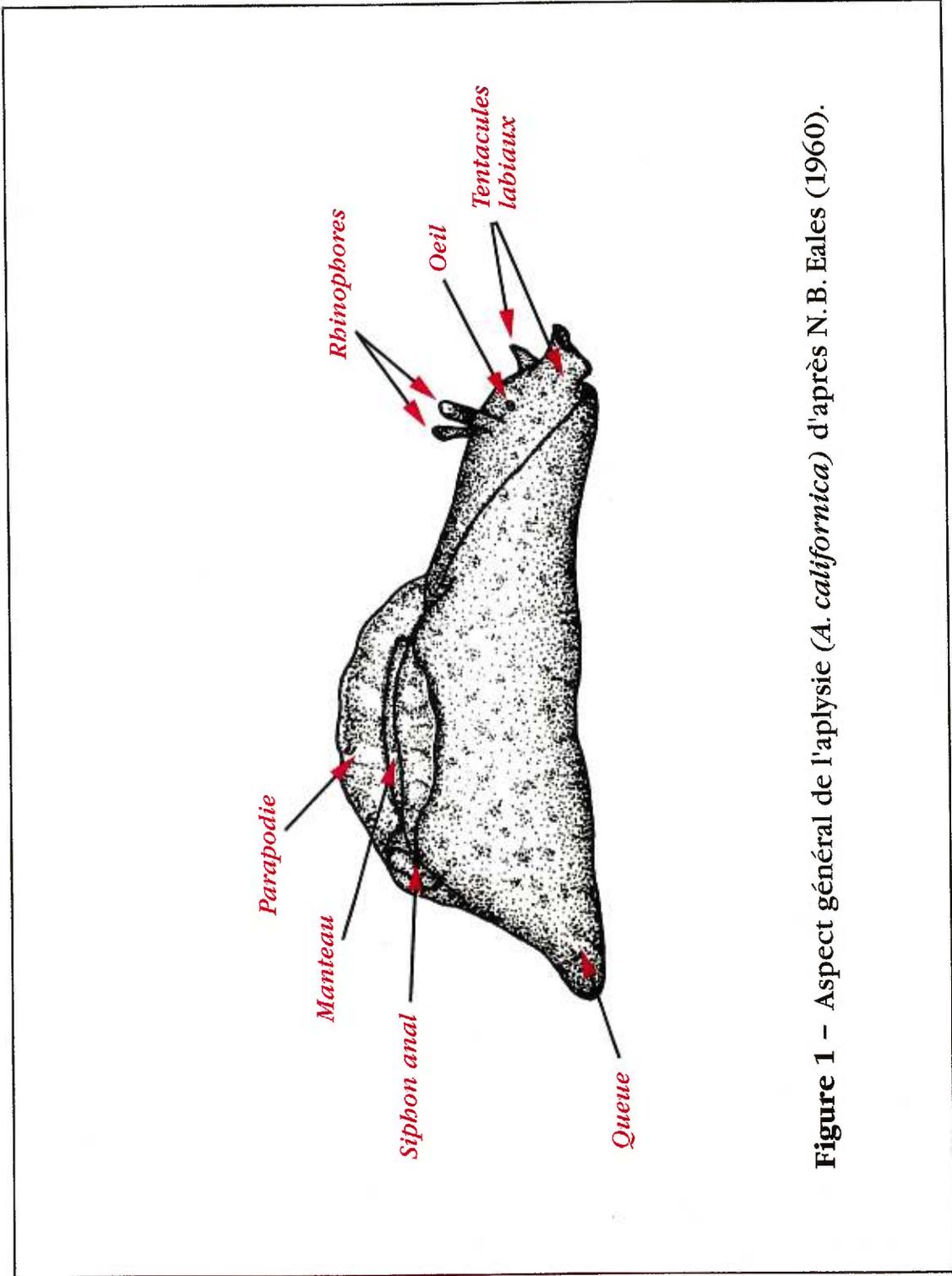


Figure 1 – Aspect général de l'aplysie (*A. californica*) d'après N. B. Eales (1960).

L'ouïe est une autre cible de la 5-HT. Des travaux d'histochimie révèlent la présence du neurotransmetteur dans les fibres qui innervent les muscles branchiaux (Carpenter *et al.*, 1971). On sait par ailleurs que la 5-HT accroît la quantité d'AMPc de 10 fois dans ce tissu *via* un récepteur à la sérotonine ergot-sensible (Drummond *et al.*, 1980). Le réflexe de mastication est modulé en partie par la 5-HT produite par une paire de neurone situés dans les ganglions cérébraux. Ces neurones, appelés cellules métacérébrales (CMC), projettent des terminaisons nerveuses dans le ganglion buccal où, de concert avec d'autres afférences, ils modulent un ensemble de comportements liés à l'alimentation de l'aplysie. Les CMC ont aussi une action modulatrice périphérique sur les muscles de la masse buccale. La modulation de la contraction musculaire passe dans ce cas par la production d'AMPc et l'augmentation du taux de phosphorylation des protéines du tissu musculaire (Weiss *et al.*, 1979 ; Weiger, 1997).

La capacité d'apprentissage et de mémoire chez l'aplysie est un comportement réflexe qu'on tente d'expliquer depuis de nombreuses années au niveau cellulaire et moléculaire. L'étude de ce système a mobilisé beaucoup d'efforts de recherches puisqu'il offrait un modèle simple pour comprendre la plasticité neuronale au niveau moléculaire. Ces travaux ont contribué à une meilleure compréhension du rôle biologique joué par la sérotonine. L'accoutumance et la sensibilisation sont deux formes d'apprentissage adaptatif non associatif. La diminution de la réponse à un stimulus, par suite de la répétition de ce stimulus est qualifié d'accoutumance. Cet effet est observé chez l'aplysie lorsqu'il y a rétraction de l'ouïe et du siphon à la suite d'une stimulation tactile localisée. Si un stimulus douloureux est alors appliqué sur la tête ou la queue de l'animal on observera une augmentation de l'efficacité de la synapse entre le neurone sensoriel (présynaptique) et le neurone moteur (postsynaptique) qui participent au réflexe de

rétraction. Ce dernier phénomène est appelé sensibilisation. Des neurones sérotoninergiques sont impliqués dans ce processus appelé facilitation présynaptique. L'application de sérotonine sur la synapse sensori-motrice mime l'effet de la facilitation. On sait que cet effet implique l'intervention d'une protéine G et la production du second messager AMPc responsable de l'activation de la PKA. Parallèlement, on observe que la PKC est aussi activée par l'application de sérotonine sur cette synapse. Cette dernière voie est vraisemblablement activée par le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2B} récemment cloné (Li *et al.*, 1995).

Le système nerveux de l'aplysie gère de nombreuses fonctions où le rôle de la sérotonine n'est pas très bien compris. Prenons l'exemple de la régulation de la rythmicité circadienne chez l'aplysie. L'oeil isolé conserve un rythme robuste soutenu par un oscillateur circadien. Les phases observées durant le rythme peuvent être modifiées (retardées ou avancées) par l'exposition de l'oeil à la lumière ou l'application de sérotonine. L'ajout de ce neurotransmetteur a un effet sur le taux d'AMPc produit dans l'oeil isolé (Eskin *et al.*, 1982). Le comportement reproducteur est une autre des fonctions où les neurotransmetteurs aminergiques sont étudiés chez l'aplysie. Les cellules neuroendocrines (bag cells) du ganglion abdominal sont des cellules neurosécrétrices riches en granules qui contiennent une hormone polypeptidique impliquée dans la ponte. Un contrôle sérotoninergique agissant par l'intermédiaire de l'AMPc est présumé jouer un rôle sur l'activité de ces neurones. Le rôle en question demeure à élucider (Kaczmarek *et al.*, 1978).

L'expression et la distribution des récepteurs à la sérotonine chez *Aplysia* sont en partie connues et seulement deux de ces récepteurs ont été clonés et caractérisés. Le

clonage de récepteurs s'avère être particulièrement utile pour les études menées *in vivo*. En effet, les voies de signalisation empruntées lors de l'activation du récepteur peuvent être comprises d'une manière plus approfondie si le récepteur étudié *in situ* a été au préalable pharmacologiquement et structurellement identifié et localisé.

1.2 Les récepteurs à la sérotonine clonés chez les invertébrés

Avec le récepteur à la sérotonine nouvellement cloné chez l'aplysie et faisant l'objet de ce mémoire, 11 séquences de récepteurs à la sérotonine sont connues chez les invertébrés. La structure primaire de la plupart de ces récepteurs présentent des homologies de séquences avec la famille des récepteurs 5-HT1 et tout comme chez les vertébrés le couplage à la protéine G implique le plus souvent qu'autrement la modulation de la production d'AMPc. L'identification de ces récepteurs pose des problèmes puisque le champs d'étude de la pharmacologie des récepteurs d'invertébrés demeure marginal et doit encore se référer aux données obtenues chez les vertébrés. Cette section présente une description sommaire des 10 récepteurs à la sérotonine clonés chez 5 espèces d'invertébrés.

1.2.1 Les récepteurs à la sérotonine 5-HTdro-1, 5-HTdro2A, 5-HTdro2B et 5-HT- 2Dro chez la mouche

Il existe 4 récepteurs à la sérotonine qui ont été clonés et caractérisés chez la drosophile. Le premier récepteur isolé est le 5-HTdro-1 (Witz *et al.*, 1990). De par sa structure et son couplage positif à l'adényl-cyclase, ce récepteur de 564 résidus est classé

comme un membre de la famille des 5-HT₇ (Walker *et al.*, 1996). La région amino-terminale possède une région hydrophobe qui constitue le huitième segment hydrophobe du récepteur, les 7 autres étant les régions des transmembranaires caractéristiques de la famille des récepteurs couplés à la protéine G.

Les récepteurs 5-HT_{dro2A} (834 résidus) et 5-HT_{dro2B} (645 résidus) se ressemblent à plus d'un point de vue. Ils partagent une homologie de séquence élevée (84% de similitude entre les régions des transmembranaires) et sont tous deux considérés membres du groupe des récepteurs 5-HT₁ de vertébrés. Aussi bien l'adényl-cyclase que la phospholipase C (PLC) sont stimulées lors de l'activation de ces 2 récepteurs. Ce mode de transduction à double action est connu chez d'autres récepteurs de la famille, le récepteur α 2-adrénergique en est un exemple (Cotecchia *et al.*, 1990). L'expression du récepteur 5-HT_{dro2A} est observée chez la larve à un stade avancé de son développement. Chez l'animal adulte, on retrouve des transcrits dans la tête seulement. Une localisation plus fine faite à l'aide d'une histohybridation *in situ* révèle que les messagers 5-HT_{dro2A} sont exprimés dans des motoneurones qui innervent les muscles de la larve. Un patron d'expression similaire, quoique plus complexe, est aussi observé chez la larve pour les transcrits des 5-HT_{dro2B} et 5-HT_{dro1}. Toutefois, il semble que chacun de ces 3 récepteurs sont retrouvés dans différentes populations de cellules du système nerveux central de la larve.

Le 5-HT-2Dro est le quatrième récepteur à la sérotonine cloné chez la drosophile (Colas *et al.*, 1995). Ce récepteur de 868 résidus possède aussi une huitième région hydrophobe. Le récepteur exprimé dans des cellules COS-1 ressemble d'un point de vue

pharmacologique aux récepteurs des vertébrés de la famille 5-HT₂. La larve exprime fortement le 5-HT-2Dro à la troisième heure de son embryogénèse.

1.2.2 Le récepteur à la sérotonine (clone#18) de la barnacle

Chez la barnacle les tout premiers stades du développement sont régulés par des neurotransmetteurs aminergiques, entre autres, la sérotonine. Un récepteur à la sérotonine de 379 acides aminés a été isolé chez *Balanus amphitrite* dont la séquence ressemble aux récepteurs 5-HT₁ et plus particulièrement au 5-HT_{1A} humain. La pharmacologie de ce nouveau récepteur n'est pas encore connue (Kawahara *et al.*, 1997).

1.2.3 Les récepteurs à la sérotonine 5-HT_{LYM} et 5-HT_{2LYM} chez le mollusque

L. stagnalis

Le profil pharmacologique du premier récepteur à la sérotonine cloné chez le mollusque *Lymnaea stagnalis*, le 5-HT_{LYM}, suggère que ce récepteur appartient à la famille des 5-HT₁ de vertébrés. Cette parenté probable est corroborée par une étude d'homologie qui place sur l'arbre phylogénétique le récepteur 5-HT_{LYM} à proximité des récepteurs 5-HT_{dro2A} et 5-HT_{dro2B} de la drosophile et du récepteur humain 5-HT_{1A}. Quoique la voie de transduction empruntée par ce récepteur ne soit pas connue, d'autres raisons, autres celles mentionnées plus haut, suggèrent que le 5-HT_{LYM} inhibe l'adényl-cyclase. En effet, la troisième boucle intracellulaire de longueur inhabituelle (la longueur la plus couramment rencontrée est de 70-80 résidus; chez 5-HT_{LYM} la boucle est constituée de 150 résidus) accompagnée d'une queue cytoplasmique courte (elle ne comprend que 24 résidus chez 5-HT_{LYM}) sont des caractéristiques structurales souvent

rencontrées parmi les récepteurs capables d'inhiber l'adényl-cyclase. Ce récepteur de 509 résidus est exprimé dans le cerveau et le coeur de l'animal (Sugamori *et al.*, 1993).

Toujours chez *L. stagnalis*, un autre récepteur à la sérotonine de 885 résidus a été isolé et caractérisé. Ce récepteur étonne par sa structure où on y trouve une très longue queue extracellulaire de 280 résidus (elle contient rarement au-delà de 100 résidus). La pharmacologie de ce récepteur est typique de celle rencontrée chez les récepteurs des vertébrés 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Le récepteur 5-HT_{2LYM} active une PLC et est avant tout exprimé dans les tissus situés en périphérie. Ce patron d'expression est aussi le propre du récepteur 5-HT_{2B} de vertébrés (Gerhardt *et al.*, 1996).

1.2.4 Les récepteurs à la sérotonine Ap5-HT-B1 et Ap5-HT-B2 chez l'aplysie

Deux récepteurs à la sérotonine ont été clonés chez l'aplysie. Le Ap5-HT-B2 (453 acides aminés) est exprimé dans le système nerveux central de l'animal alors que le Ap5-HT-B1 (422 acides aminés) est retrouvé dans le système reproducteur (Li *et al.*, 1995). L'homologie de séquence partagée par ces 2 récepteurs est élevée, (79.5 %) et atteint 90% lorsque la comparaison est restreinte aux régions transmembranaires. Toutefois, l'analyse phylogénétique place ces 2 récepteurs dans un sous-groupe éloigné des autres récepteurs à la sérotonine. Le sous-type 5-HT₆ de vertébrés s'avère être le plus proche parent des récepteurs de l'aplysie (Walker *et al.*, 1996). Quoique ces 2 récepteurs activent une phospholipase C, leurs séquences ressemblent davantage aux récepteurs de type 5-HT₁ qu'à ceux de types 5-HT₂. Cette observation est d'ailleurs généralisée à la plupart des récepteurs sérotoninergiques d'invertébrés et confirme une fois de plus l'hypothèse de

Peroutka (1994) qui propose que tous les récepteurs couplés à la protéine G trouvent un ancêtre commun dans un récepteur primordial de type 5-HT1.

1.2.5 Le récepteur à la sérotonine 5-HT-Ce du nématode *C. elegans*

Plusieurs neurones sérotoninergiques impliqués dans les fonctions de locomotion, de nutrition et de reproduction ont fait l'objet d'étude chez *Caenorhabditis elegans* mais aucune séquence de récepteur n'avait été élucidée jusqu'à récemment. Le récepteur maintenant séquencé de 445 acides aminés présente des caractéristiques pharmacologiques peu comparables à celles des récepteurs de vertébrés mais néanmoins similaires aux récepteurs d'invertébrés (Olde et McCombie, 1997). Une phylogénie faite par ces auteurs à partir de comparaisons de séquences sérotoninergiques connues chez d'autres espèces place le récepteur du nématode dans le groupe des récepteurs 5-HT1. L'inhibition de l'adényl-cyclase exercée par tous les récepteurs 5-HT1 est aussi observée pour le récepteur de *C. elegans* quoiqu'elle soit incomplète.

1.3 Évolution: le point de vue des moléculaires

Depuis le milieu de ce siècle, les progrès technologiques ont permis l'acquisition de données de nature moléculaire. L'immunologie, l'hybridation de l'ADN et le séquençage de protéines ou de gènes produisent des données maintenant fréquemment utilisées pour évaluer les distances évolutives séparant les espèces. La connaissance de la structure des récepteurs d'invertébrés nous éclaire non seulement sur l'origine des différents sous-types de récepteurs et de leur conservation tout au long de la phylogénie

animale mais aussi fournit des données supplémentaires pour mieux évaluer la phylogénie des embranchements inférieurs.

1.3.1 Le problème de la phylogénie chez les mollusques

Le schéma classique illustrant l'évolution des métazoaires a été construit dans sa presque totalité à partir de travaux en anatomie et en embryologie comparatives. La paléontologie y a certes joué un rôle mais la tâche devient ardue pour ne pas dire impossible pour la science des fossiles lorsque les inférences phylogénétiques portent sur des espèces anciennes. L'origine des mollusques fait depuis longtemps l'objet d'une grande controverse. En fait, depuis la fin du 19^{ième} siècle, les zoologistes ne s'entendent pas sur l'ascendance de cet embranchement. Pour certains, un animal dépourvu de segments, du type vers plat, est à l'origine de l'apparition des mollusques. Pour d'autres, l'ancêtre est un animal métamérisé de la lignée des annélides. La découverte d'un animal possédant une segmentation primitive, le *Neopilina* (Lemche, 1957), donna du crédit à cette dernière hypothèse. Toutefois, l'autre tradition persiste et ravive un débat vieux de cent ans (Ghiselin, 1988). Dès les années '60, la comparaison de la structure primaire de protéines pour des fins d'études phylogénétiques est considérée comme une approche valable (Zuckerlandl et Pauling, 1965). Toutefois, certaines contraintes s'appliquent pour que cette démarche soit cohérente d'un point de vue taxonomique. En premier lieu, la protéine choisie doit être ubiquitaire. De plus, elle ne doit être ni trop grosse, ni trop complexe. Sous ce jour, la famille des protéines couplés à la protéine G répond bien à ces critères. Cependant nous ne sommes pas au point de construire des phylogénies rigoureuses chez les invertébrés à l'aide de seules données moléculaires. Le petit nombre de données de la sorte disponibles chez l'ensemble des invertébrés en est la cause. Pour le

moment, la comparaison des séquences nous informe plus sur l'évolution des molécules que sur l'évolution des espèces (Mangum, 1990).

1.3.2 L'antiquité des récepteurs sérotoninergiques

Les récepteurs à la sérotonine sont les mieux représentés de la famille des récepteurs couplés à la protéine G. L'antiquité de ces récepteurs est à la source de leur nombre et de leur diversité. Selon Peroutka (1994), les premiers récepteurs de la famille des récepteurs possédant 7 segments transmembranaires ressemblaient aux récepteurs sérotoninergiques, le type 5-HT₁ étant considéré le plus ancien. On trouve en effet des récepteurs 5-HT chez la plupart métazoaires inférieurs et leur présence n'est pas exclue chez les eucaryotes unicellulaires puisqu'on observe que cette amine stimule la synthèse d'AMPc chez *Tetrahymena* (Rosenzweig et Kindler, 1972).

1.4 Les récepteurs sérotoninergiques

Au cours des années '50, on découvre les deux premiers récepteurs à la sérotonine, le récepteur M et le récepteur D. À l'époque, le site M et le site D sont différenciés selon la réponse physiologique obtenue à la suite de l'application de drogues supposées antagonistes, la morphine et la dibenzylène respectivement (Gaddum et Picarelli, 1957). Puis, au début des années '70, on constate qu'il existe dans le système vasculaire du chien un récepteur à la sérotonine qui ne ressemble ni au type M, ni au type D (Saxena *et al.*, 1971). C'est le début de découvertes successives de plusieurs nouveaux récepteurs à la sérotonine. Les méthodes de radioliation développées au cours des années '70 ainsi que l'avènement de nouvelles drogues ont fait de la pharmacologie un outil

puissant pour caractériser les récepteurs. Depuis, de nouveaux progrès techniques offrent des moyens supplémentaires qui aident à la caractérisation et à la classification des récepteurs. Selon Saxena (1995), trois critères permettent de caractériser un récepteur. Les récepteurs sont avant tout classés selon une base de critères opérationnels qui consiste à caractériser un site par des essais pharmacologiques. Outre leurs propriétés pharmacologiques respectives, les mécanismes de transduction associés aux récepteurs permettent de les différencier aisément. Le récepteur étudié est-il lié à un canal ionique ou bien est-il couplé à une protéine G ? Le cas échéant, quel type d'effecteur y est associé ? Depuis les années '80, le clonage de plusieurs récepteurs a permis de faire des rapprochements quant à la similarité des séquences entre des récepteurs appartenant à un même groupe. Toutefois, ce critère structural n'est pas absolu. Il arrive que des récepteurs présentant des homologies de séquences importantes opèrent de manière différente. L'inverse est aussi observé (Saxena, 1995).

1.4.1 La diversité des récepteurs à la sérotonine

Peroutka et Snyder (1979) furent les premiers à montrer par radioliation l'existence de types distincts de récepteurs. Ils observèrent que les récepteurs 5-HT₁ sont caractérisés par une haute affinité (K_d = nanomolaire) pour la sérotonine par opposition aux récepteurs 5-HT₂ dont l'affinité pour le ligand endogène est près de mille fois plus faible. Par la suite, on découvrit de nombreux sous-types de récepteurs 5-HT₁ à l'aide de ligands sélectifs. Les sous-types 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} (Pedigo *et al.*, 1981; Middlemiss et Fozard, 1983), le 5-HT_{1D}, dont on connaît deux souches (Heuring et Peroutka, 1987; Sumner et Humphrey, 1989), le 5-HT_{1E} (Leonhardt *et al.*, 1989) et le 5-HT_{1F} (Amlaiky *et al.*, 1992; Adham *et al.*, 1993) sont jusqu'à maintenant les récepteurs 5-HT₁

caractérisés. Comme les récepteurs 5-HT1, la famille des 5-HT2 forme un groupe mixte composé des trois sous-types suivants: le 5-HT2A (Pritchett *et al.*, 1988), le 5-HT2B (Foguet *et al.*, 1992) et le 5-HT2C, autrefois classé parmi les 5-HT1 (Pazos *et al.*, 1984; Julius *et al.*, 1988; Saltzman *et al.*, 1991). À l'instar des récepteurs de la drosophile, les récepteurs 5-HT2C ont la particularité de posséder huit domaines hydrophobes au lieu des sept caractéristiques retrouvés chez les récepteurs couplés à la protéine G (Saudou et Hen, 1994). Les récepteurs 5-HT5 présentent, au niveau structural, très peu de similarité avec les autres familles de récepteurs sérotoninergiques. Au mieux, on leur trouve 37% de similarité avec le 5-HT_{dro2A} de la drosophile (Saudou *et al.*, 1992). Cette famille se subdivise en deux sous-types: le 5-HT5A (Plassat *et al.*, 1992) et les 5-HT5B (Matthes *et al.*, 1993; Erlander *et al.*, 1993). Le degré d'homologie qu'ils partagent est élevé (77%) (Plassat *et al.*, 1992). Les autres familles de récepteurs à la sérotonine sont chacune représentées par un seul type et comprennent les récepteurs 5-HT3, 5-HT4, 5-HT6 (Monsma *et al.*, 1993) et 5-HT7 (Bard *et al.*, 1993). Des récepteurs à la sérotonine, seul le 5-HT3 n'est pas couplé à la protéine G. Ce récepteur-canal ionique sodium/potassium ressemble dans son fonctionnement, dans ses modes de régulation ainsi que dans sa structure moléculaire au récepteur nicotinique de l'acétylcholine et au récepteur NMDA du glutamate (Yakel *et al.*, 1990 et Maricq *et al.*, 1991). Les membres de la famille 5-HT4 n'ont été clonés que récemment. Des différences observées dans la pharmacologie de ce récepteur selon sa provenance, soit le colon du cobaye versus l'oesophage du rat, incitèrent à en déterminer la séquence. Deux souches ont été clonées: le 5-HT4S représente la forme "courte" tandis que la forme "longue" est appelée 5-HT4L (Claeyssen *et al.*, 1996). Les voies de transduction empruntées lors de l'activation des récepteurs à la sérotonine sont relativement bien connues. L'effecteur, une adényl-cyclase ou la phospholipase C, peut être inhibé ou encore activé selon le type de protéine G

sélectionnée par le récepteur. Certains récepteurs sont capables d'activer plus d'une voie de transduction à la fois en recrutant différentes protéines G. En règle générale, les récepteurs 5-HT1, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 et le 5-HT7 sont couplés, par l'intermédiaire d'une protéine G, à l'adénylate cyclase tandis que les récepteurs 5-HT2 agissent *via* la voie du phosphoinositol produit par la PLC.

1.4.2 Les voies de transduction empruntées par les récepteurs à la sérotonine

Les enzymes responsables de la formation des seconds messagers associés aux récepteurs sérotoninergiques sont l'adényl-cyclase et la phospholipase C. L'adényl-cyclase est une protéine membranaire qui utilise l'ATP (adénosine triphosphate) comme substrat pour produire le second messenger AMPc (cyclic adenosine monophosphate). Le site catalytique de cette enzyme est situé vers la face cytoplasmique de la membrane. L'AMPc générée par ce site est libérée dans le cytosol et active des protéines kinases intracellulaires qui à leur tour phosphorylent une variété de substrats protéiques. L'effecteur des récepteurs 5-HT2, la phospholipase C (PLC), est une enzyme soluble qui utilise les substrats membranaires du phospho-inositol. Le phospholipide hydrolysé produit le diacylglycérol (DAG), nécessaire à l'activation de la protéine kinase C (PKC) et l'inositol triphosphate (IP₃) qui joue un rôle important dans la libération du calcium intracellulaire. La figure 2 illustre les deux voies de transduction activées par un récepteur hypothétique qui dans un cas agit via la PLC et dans l'autre cas via l'adényl-cyclase.

1.4.3 Le complexe récepteur/protéine G/effecteur

Lorsque le ligand se lie à son récepteur, il induit chez celui-ci un changement de conformation. Le récepteur activé active à son tour une protéine associées à la face cytoplasmique de la membrane appelée protéine G. Cette protéine qui se place comme un intermédiaire entre le récepteur et l'effecteur joue un rôle clé dans le choix de la voie de transduction empruntée lors de l'activation du récepteur par son neurotransmetteur. Il existe en effet de nombreux isoformes de la protéine G, chacun agissant sur un effecteur spécifique, le type d'action exercée pouvant être stimulatrice ou inhibitrice. Les trois sous-unités de la protéine G sont appelées $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. La sous-unité $G\alpha$, qui possède un site nucléotidique, lie le GDP. Dans cet état, $G\alpha$ -GDP forme un complexe stable avec le dimère $G\beta$ - $G\gamma$. Lorsque les domaines intracellulaires du récepteur activé entrent en contact avec l'hétérotrimère, le GDP est remplacé par le GTP et les sous-unités $G\alpha$ -GTP et $G\beta$ - $G\gamma$ perdent l'affinité qu'elles avaient l'une pour l'autre. Dissociées l'une l'autre, $G\alpha$ et $G\beta$ - $G\gamma$ sont maintenant capables d'exercer leur rôle auprès de l'effecteur. La spécificité de la protéine G pour l'effecteur a été longtemps attribuée à la sous-unité $G\alpha$ avant que des études menées chez la levure viennent reconnaître le rôle de signalisation joué par les sous-unités $G\beta$ - $G\gamma$ (Sprague, 1991). Logothesis *et al.* (1987) furent les premiers à faire la preuve du contraire, chez des cellules de type mammifère, en montrant le rôle modulateur joué par les sous-unités $G\beta$ - $G\gamma$ auprès des canaux potassiques activés par l'acétylcholine. On admet aujourd'hui que le complexe $G\beta$ - $G\gamma$ est aussi apte que $G\alpha$ à réguler l'effecteur. Nous connaissons actuellement 23 $G\alpha$, 6 $G\beta$ et 12 $G\gamma$. En théorie, 1440 combinaisons trimériques offrent autant d'options de voies de transduction (Clapham et Neer 1997; Gudermann *et al.* 1996). La diversité touche non seulement les

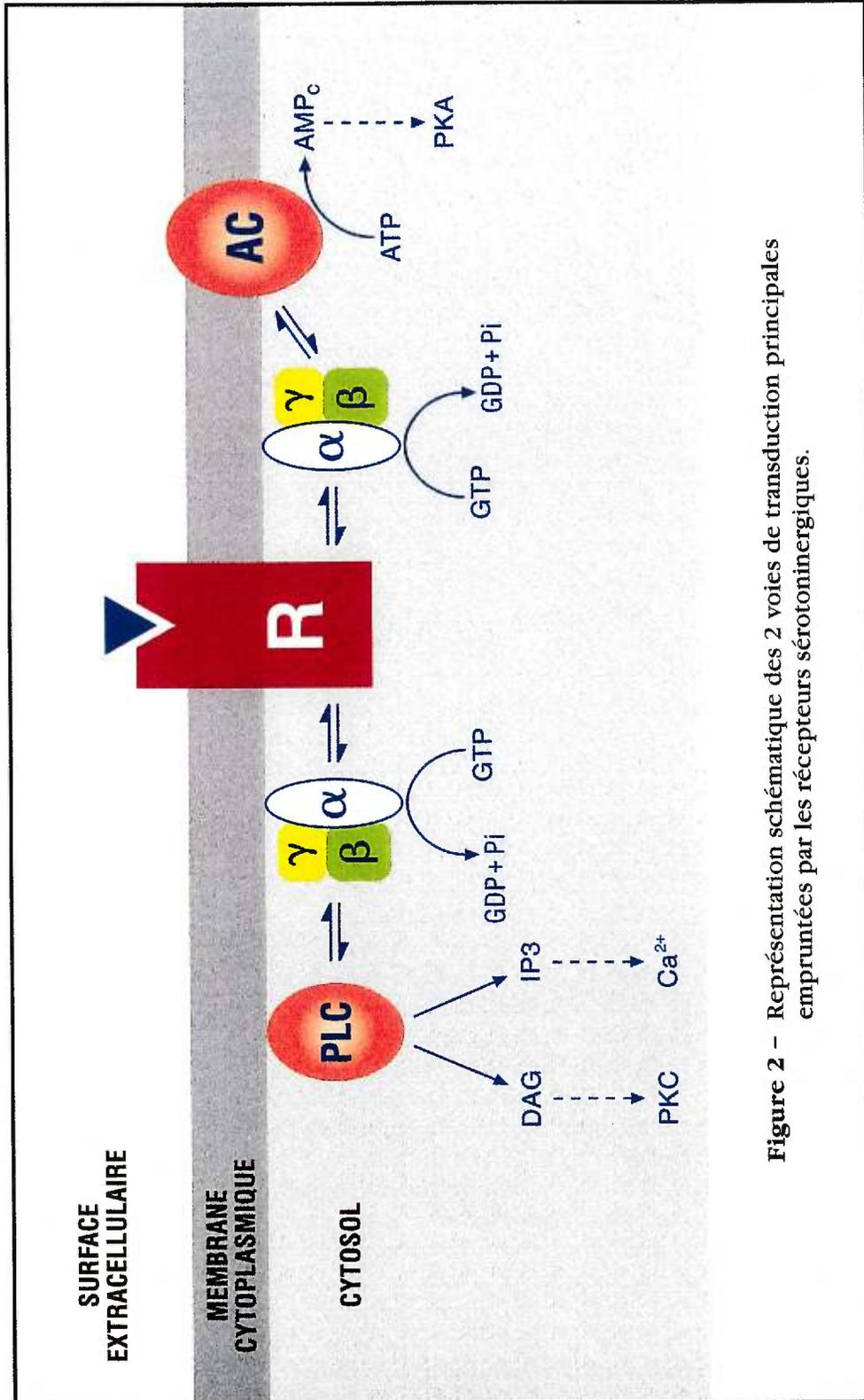


Figure 2 - Représentation schématique des 2 voies de transduction principales empruntées par les récepteurs sérotoninergiques.

récepteurs et les protéines G mais aussi les effecteurs. Par exemple, pour l'adényl-cyclase il existe sept isoformes distincts, tous pouvant être stimulés ou inhibés par des protéines G. De même, la phospholipase C possède plusieurs isoformes impliqués dans une variété de voies intracellulaires. Il n'est pas rare de voir une même protéine G activer deux voies de transductions différentes. Cette absence de fidélité qui est aussi observée chez le récepteur vis-à-vis la protéine G assure la diversité du signal.

1.5 La régulation du récepteur

L'activation du récepteur par le ligand qui mène à la production des seconds messagers, AMPc ou IP3, est très tôt suivie de mécanismes de rétrocontrôle négatif qui modulent l'intensité et la durée de la réaction. La recapture par les transporteurs ainsi que la dégradation extracellulaire des peptides, des amines biogènes et des autres neurotransmetteurs sont les premiers systèmes de régulation qui préviennent la surexposition du récepteur aux ligands (Böhm *et al.*, 1997). Par ailleurs, il existe des mécanismes de régulation qui touchent directement le récepteur. Ces mécanismes nous intéressent particulièrement puisqu'ils opèrent sur des domaines spécifiques de la structure. La désensibilisation et la séquestration sont deux d'entre eux. Ces modes de régulation seront abordés en utilisant comme exemple le récepteur β -2-adrénergique (β 2AR) qui peut être considéré à plusieurs titres comme le prototype des récepteurs couplés à la protéine G (Ostrowski *et al.*, 1992).

1.5.1 La désensibilisation

La désensibilisation consiste à diminuer graduellement la réactivité du récepteur à un stimulus au cours du temps alors que l'on maintient le stimulus à un même niveau d'intensité. Cette diminution de la réactivité du récepteur envers l'agoniste est mesurée chez le β 2AR par une baisse graduelle de production d'AMPc. Cette baisse de production du second messager est en fait une conséquence de la diminution de la stimulation de l'adényl-cyclase par Gs. Cette perte de capacité du récepteur d'interagir avec la protéine G est une des étapes de la désensibilisation appelée découplage fonctionnel. Le découplage s'accompagne d'une augmentation du niveau de phosphorylation du récepteur effectuée par deux kinases distinctes. La première, la kinase du récepteur β -adrénergique (β ARK), appartient à la famille des kinases des récepteurs couplés à la protéine G (GRK). Elle phosphoryle le récepteur à la condition qu'il soit occupé par l'agoniste. Ce sont des changements conformationnels du récepteur, à la suite de la liaison de l'agoniste, qui rendent possible l'action de la β ARK. Toutefois, β ARK ne saurait provoquer le découplage sans qu'intervienne son cofacteur, la protéine β -arrestine (figure 3) (Benovic *et al.* 1987). En effet, la liaison de l'arrestine sur le récepteur phosphorylé par β ARK se fait au détriment de la liaison du récepteur avec la protéine G (Pitcher *et al.*, 1992).

La seconde kinase impliquée dans le processus de découplage est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Sa participation au découplage se fait par le biais de mécanismes autres que ceux utilisés par la β ARK. Contrairement à cette dernière, la PKA ne mobilise pas l'arrestine. La phosphorylation du récepteur par la PKA suffit à elle seule pour rompre l'interaction entre la protéine G et le récepteur. Une nouvelle

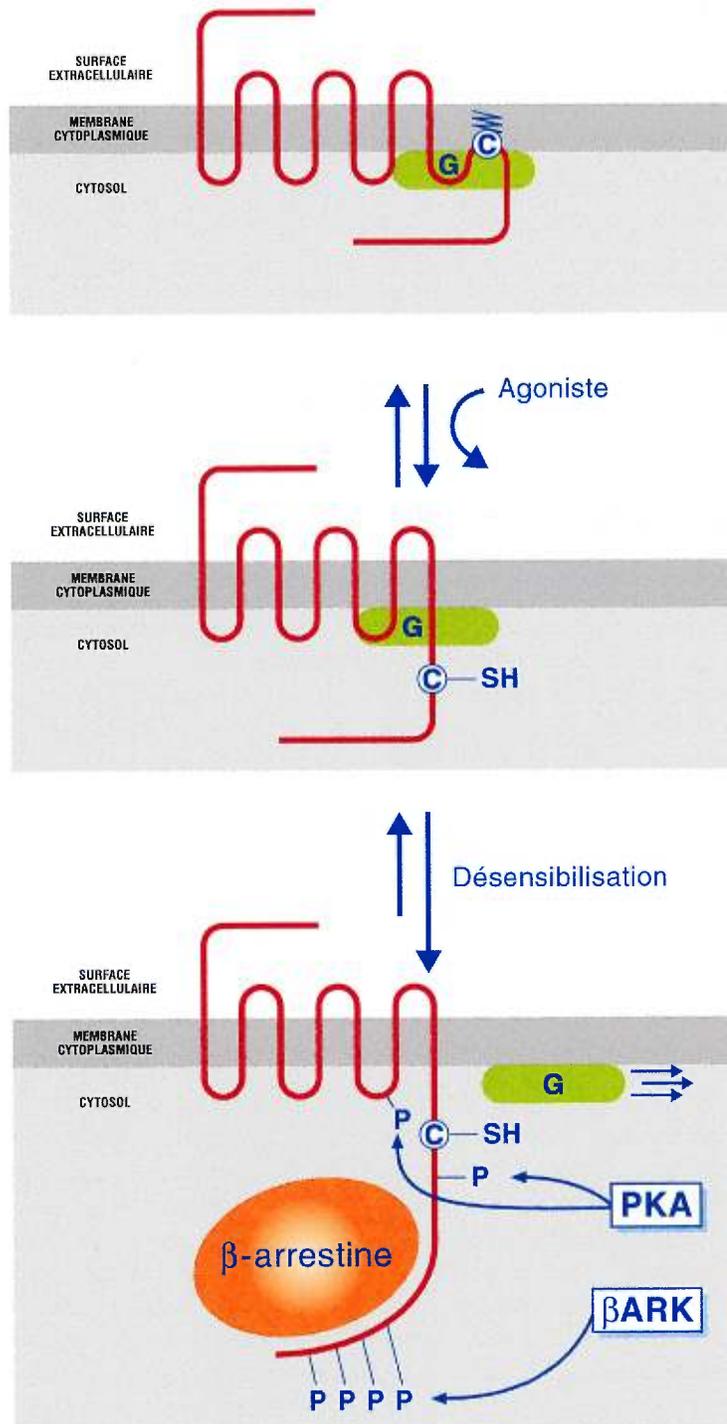


Figure 3 – Modèle de régulation concertée de la palmitoylation et de la phosphorylation du β_2 AR (d'après Bouvier *et al.*, 1995).

répartition des charges sur le récepteur phosphorylé est probablement la cause, dans ce cas-ci, du découplage.

Le rôle joué par la PKA dans la fonction de découplage fonctionnel s'exerce à des niveaux différents de celui de la β ARK. À de faibles concentration d'agonistes (< 10 nM), la PKA est la seule kinase mobilisée tandis que la β ARK nécessite 100 fois plus de ligand pour supplanter le taux de découplage induit par la PKA seule (Lohse *et al.*, 1990). La raison pour laquelle il existe deux niveaux de régulation demeure obscure mais il a été proposé que le découplage résultant de l'action de β ARK s'exercerait dans des cas nécessitant une régulation rapide tel que pour les récepteurs synaptiques exposés à de fortes concentrations de catécholamines. Quant à la PKA, elle pourrait jouer un rôle plus important dans des régions périphériques où les tissus sont exposés à des concentrations faibles de ligand.

Différents récepteurs sont soumis à des processus de régulation distincts. L'absence d'une conservation stricte des domaines de régulation rend compte des variations fonctionnelles observées d'un récepteur à l'autre. Quoique certaines études suggèrent l'existence de motifs-consensus reconnus par les kinases, plusieurs études font état de l'absence de tels patrons en montrant que le taux de phosphorylation est influencé par une multitude de facteurs. La nature et l'intensité du stimulus, le type de lignées cellulaire utilisées, le niveau d'activité de la kinase ainsi que de celui du récepteur et l'environnement en acides aminés du résidu à phosphoryler sont autant d'éléments qui peuvent modifier l'activité de l'enzyme (Böhm *et al.*, 1997). Sans être capable d'identifier d'une manière absolue les domaines phosphorylés par les kinases, de nombreux travaux

ont montré qu'il existe des régions communes partagées par plusieurs récepteurs impliqués dans ce processus de régulation.

Les sites de phosphorylation choisis par la plupart des kinases sont les groupes hydroxyl des sérines, des thréonines et des tyrosines. La présence de ces acides aminés n'est pas garante d'une phosphorylation; encore faut-il que le résidu occupe un environnement propice déterminé par la nature des résidus adjacents. Dans le but de trouver les résidus-cibles des récepteurs pouvant être phosphorylés par les kinases, des études ont été entreprises sur de nombreux récepteurs. Les études de mutagenèse dirigées révèlent que la phosphorylation impliquée dans les processus de découplage se fait préférentiellement sur la troisième boucle intracellulaire et sur la queue carboxy-terminale du récepteur. À la lumière de ces informations, des peptides synthétiques correspondant à ces deux régions cibles ont été utilisés en guise de substrat pour la kinase de la rhodopsine et celle du récepteur β -adrénergique (β ARK). Ces dernières expériences ont révélé l'existence d'un motif (Glu/Asp-X-Ser) commun à plusieurs récepteurs et pouvant être la cible des kinases (Palczewski *et al.*, 1989; Onorato *et al.*, 1991). Les sites consensus de phosphorylations ciblés par la PKA et la PKC ont été bien caractérisés chez le récepteur β 2-adrénergique (Blake *et al.*, 1987; Benovic *et al.*, 1985) . Des 2 sites phosphorylés par la PKA, l'un situé dans la troisième boucle intracellulaire et l'autre retrouvé dans la queue C-terminale, le premier joue le rôle fonctionnel le plus important (Clark *et al.*, 1989).

1.5.2 La séquestration

Après le découplage, le récepteur, toujours lié à son ligand, est transloqué de la surface cellulaire vers des vésicules intracellulaires, les endosomes, où il empruntera soit la voie de la dégradation dans les lysosomes ou soit celle du recyclage dans des endosomes réservés à cet effet. Les mécanismes intracellulaires impliqués dans le tri des récepteurs n'est pas connu. Toutefois des études suggèrent qu'il existe un motif particulier sur le récepteur capable de l'aiguiller vers les lysosomes (Trowbridge *et al.*, 1993; Mayor *et al.*, 1993). Les études portant sur le récepteur β 2AR ont montré que la séquestration est indépendante de la phosphorylation par la β ARK et la PKA (Bouvier *et al.*, 1988; Haussdorf *et al.*, 1989). Si la séquestration ne joue pas de rôle dans les processus de désensibilisation, de nombreuses preuves attestent de sa participation dans les mécanismes de resensibilisation du récepteur (Haussdorf *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1993; Sibley, 1986). La voie de recyclage du récepteur qui s'effectue dans l'enceinte de l'endosome consiste à le débarasser de son ligand et des phosphates résultant de l'action des kinases lors de la désensibilisation. Le milieu rendu acide de l'endosome permet au récepteur de se dissocier de son ligand. Ce faisant, les phosphatases endosomiques déphosphorylent le récepteur, favorisant ainsi la dissociation de la β -arrestine complexée au récepteur. Le récepteur est ensuite redirigé vers la membrane cellulaire où il peut reprendre sa fonction.

Les tyrosines de la queue carboxy-terminale des récepteurs NK1-R et de l'angiotensine II sont nécessaires à la séquestration (Böhm *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1995). Ces observations ont été cependant infirmées lorsque l'étude portait sur les récepteurs β 2AR et muscarinique m2 (Valiquette *et al.*, 1990; Goldman et Nathanson,

1994). Sans faire l'unanimité, on croit cependant que la tyrosine du motif Asn-Pro-X-X-Tyr située dans le TM7 joue probablement un rôle plus important dans la séquestration que le font les autres tyrosines. La forte conservation du motif NPXXY parmi les récepteurs couplés à la protéine G n'est pas sans suggérer qu'il joue un rôle majeur dans la fonction du récepteur.

1.5.3 La palmitoylation

La palmitoylation est une modification post-traductionnelle qui module l'activité des récepteurs. Elle consiste à thioestérifier une cystéine au moyen d'un acide palmitique. La plupart des récepteurs couplés à la protéine G possèdent sur leur queue cytosolique une ou deux cystéines pouvant être palmitoylées. Situées à 12 ou 13 résidus du segment TM VII, la cystéine palmitoylée octroie à la queue cytosolique du récepteur un moyen d'ancrage dans la membrane plasmique qui lui permet de former une quatrième boucle intracellulaire (figure 3). Trois aspects de la fonction de régulation des récepteurs dus à la palmitoylation ont été étudiés: 1) la liaison du ligand, 2) l'activation de la protéine G, et 3) le transport intracellulaire du récepteur. Le lien thioester qui attache le groupe acyl sur la cystéine est labile, permettant ainsi le contrôle de cette modification par la cellule. Il a en effet été démontré chez une dizaine de récepteurs que l'état de palmitoylation est réversible et dépend pour certains d'entre eux de la présence d'agoniste dans le milieu (Okamoto *et al.*, 1997; O'Dowd *et al.*, 1989; Ovchinikov *et al.*, 1988). L'activation continue du récepteur augmente le renouvellement du palmitate sur une cystéine de la queue cytosolique favorisant ainsi l'accès de la queue cytosolique aux kinases régulatrices. L'élévation du taux de phosphorylation observé chez le récepteur β -2-adrénergique conduit au découplage fonctionnel responsable de la désensibilisation du

récepteur. Le rôle joué par la palmitoylation dans la fonction de séquestration est controversé. De plus, le mécanisme par lequel la palmitoylation peut affecter la séquestration demeure incompris. On croit que le regroupement des récepteurs dans les caveolae avant l'endocytose dépend de l'état de palmitoylation (Parton et Simons, 1995).

1.6 La structure des récepteurs couplés à la protéine G

La première séquence connue de récepteur couplé à la protéine G fut celle de la rhodopsine bovine (Ovchinnikov, 1982). À l'époque, on ne se faisait pas d'idée précise de la morphologie de cette famille de récepteurs. Il fallut attendre les progrès techniques de la biologie moléculaire qui permirent de cloner de nombreux récepteurs et ainsi de constater les similitudes structurales partagées par l'ensemble de ses membres. Ce point tournant fut atteint avec le clonage du récepteur β -adrénergique (Dixon *et al.*, 1986). Depuis, avec la centaine de séquences de récepteurs connues, l'architecture des récepteurs fait l'objet d'études toujours plus approfondies dans le but de lier la structure à la fonction.

1.6.1 Le site de reconnaissance du récepteur

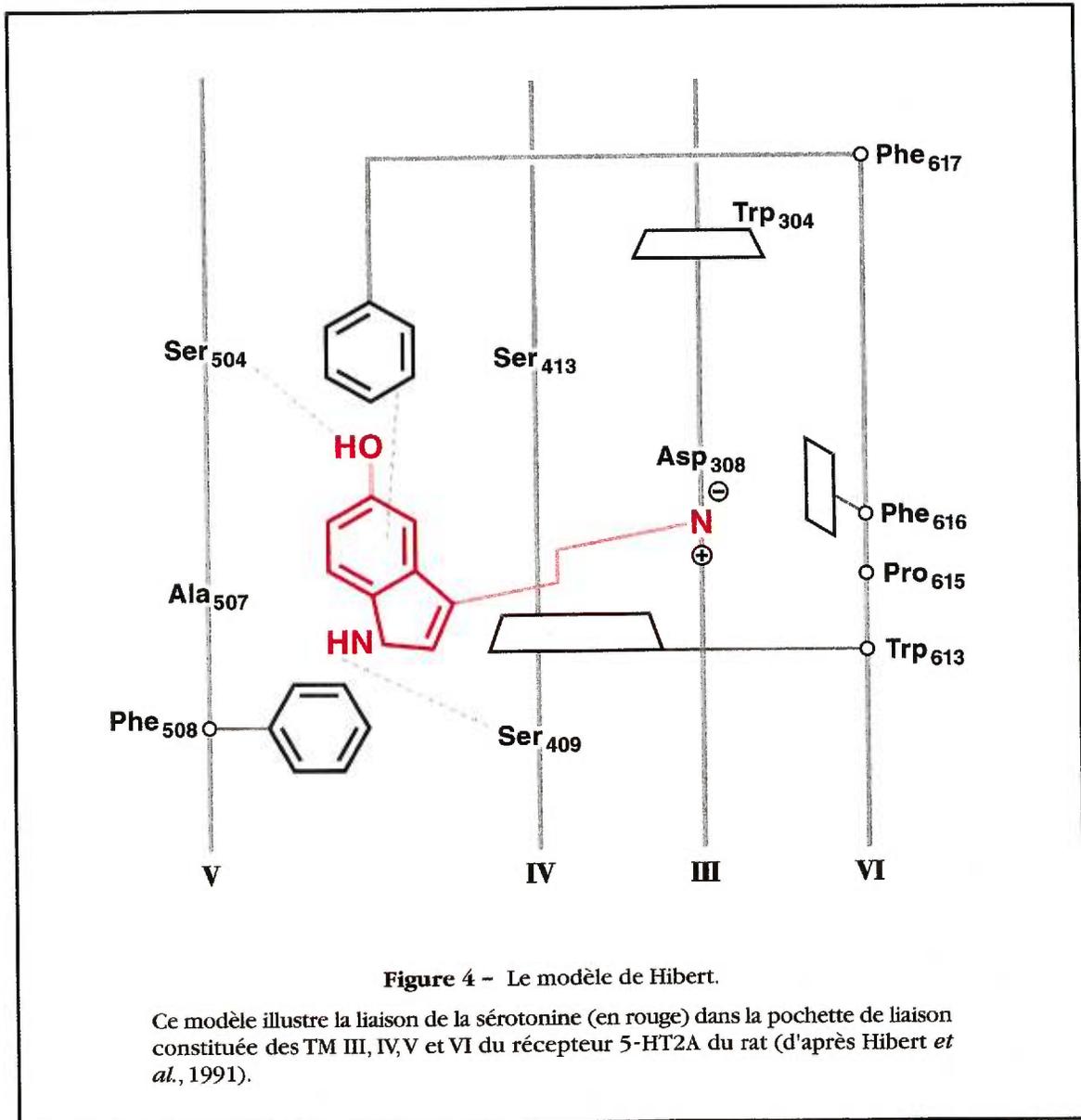
Selon les principes de la thermodynamique, la structure tertiaire adoptée spontanément par une protéine dans son milieu physiologique est déterminée par l'ensemble des interactions qui s'établissent entre les atomes la constituant. Ainsi, la seule information contenue dans la séquence d'une protéine suffit pour prédire la conformation tri-dimensionnelle qu'elle adoptera (Anfinsen, 1973). Grâce à des modèles protéiques construits à l'aide d'ordinateurs, des études dynamiques portant sur la nature et les effets

des interactions qui s'établissent entre différentes molécules ont permis d'expliquer où et comment agit le ligand auprès de son récepteur.

Les séquences des segments transmembranaires des récepteurs couplés à la protéine G contiennent de 21 à 26 acides aminés disposés en hélice alpha. Les sept hélices sont agencées autour d'un centre formant une pochette à l'intérieur de la membrane cellulaire où s'effectue la liaison du ligand qui entraîne l'activation du récepteur. Des simulations faites sur ordinateur avec le récepteur 5-HT1A humain et des ligands 5-HT (ipsapirone, et énantiomères de la méthiopropine) suggèrent qu'il existe dans la pochette de liaison du récepteur au moins 22 acides aminés qui participent à la reconnaissance et à la liaison du ligand dans le site récepteuriel (Chilmonczyk, 1995; Sylte *et al.*, 1996). Le rôle central qu'occupe le site récepteuriel dans le fonctionnement du récepteur fait en sorte qu'il existe chez les récepteurs couplés à la protéine G, quelle que soit l'espèce, un degré de conservation remarquable de ses résidus et de sa structure. Encore aujourd'hui, la structure tridimensionnelle qu'on se fait des récepteurs aminergiques repose sur des extrapolations faites à partir des études de cristallographie aux rayons-X de la bactériorhodopsine. Cette protéine n'est pas couplée à la protéine G mais les difficultés que représentent la purification et la cristallisation des récepteurs membranaires n'offraient pas d'autre choix jusqu'à récemment. Une structure cristallographique de rhodopsine bovine est maintenant disponible (Kawaguchi *et al.*, 1996). Quoique les modèles obtenus ne sont pas tout à fait exacts, ils sont très satisfaisants. Grâce à la modélisation par ordinateur accompagnée d'études de mutagenèse dirigée, les modèles disponibles demeurent des outils puissants pour mieux comprendre comment le ligand active le récepteur.

1.6.2 Le modèle de Hibert

À l'aide des connaissances acquises sur la structure tridimensionnelle de la bactériorhodopsine, Hibert et ses collaborateurs (1991) ont construit un modèle tridimensionnel du site récepteur. À partir d'une étude de comparaisons des séquences primaires de 22 récepteurs, les résidus les mieux conservés dans les régions transmembranaires servent à élaborer un modèle qui illustre le type d'interactions qui s'établit entre les domaines transmembranaires et le neurotransmetteur. La figure 4 illustre le site récepteur du récepteur 5-HT_{2A} du rat. Le site est constitué des transmembranaires III, IV, V et VI et leurs résidus les plus importants impliqués dans la liaison de l'agoniste qui est ici la sérotonine. L'acide aspartique, Asp308, forme un contre-ion avec l'ion ammonium de l'amine. Le complexe est stabilisé par les trois groupes aromatiques, Trp304, Trp613 et Phe616, qui créent un environnement hydrophobe autour de la paire d'ions ammonium. La Ser409 établit un lien hydrogène avec l'azote du groupe indole tandis que la Ser504 forme un pont hydrogène avec le groupe 5-hydroxy de l'indole de la sérotonine. Des données expérimentales ont montré que cette dernière sérine participe à la liaison de l'agoniste (Ho *et al.*, 1992). Toutefois quelques études suggèrent qu'il peut aussi y avoir une interaction entre ce résidu et l'antagoniste (Gantz *et al.*, 1992). Le cycle aromatique du neurotransmetteur est stabilisé grâce à l'existence d'une enclave hydrophobe créée par les chaînes latérales de Phe617 et de Phe508 (Choudhary *et al.*, 1993). De nombreuses données expérimentales ont validé ce modèle qui semble prévaloir pour l'ensemble des récepteurs aminergiques (Johnson *et al.*, 1993). Plusieurs études viennent compléter le modèle de Hibert. Entre autre celles portant sur des résidus situés dans les transmembranaires II et VII ajoutent à la compréhension du mode d'interaction qui s'établit entre le ligand et le récepteur. Aussi



bien les résultats d'études de simulation en dynamique moléculaire que celles de mutagenèse dirigée suggèrent qu'il existe un résidu aspartate dans le TM2 ainsi que des résidus serine et asparagine dans le TM VII jouant un rôle majeur dans la liaison du récepteur au ligand (Sylte *et al.*, 1996; Chanda *et al.*, 1993).

1.6.3 Les sites de liaisons à la protéine G: la troisième boucle intracellulaire

De même que certains corps peuvent exister dans différents états allotropes, plusieurs protéines sont susceptibles de changements d'états structuraux. Le récepteur au repos (R) et le récepteur activé (R*) décrivent les deux états structuraux principaux du récepteur. Des études récentes suggèrent en effet l'existence d'autres états transitoires par lesquels le récepteur doit passer afin d'activer sa voie de transduction (Roth *et al.*, 1997). Le modèle le plus simple du complexe ternaire (récepteur-protéine G-effecteur) propose qu'à l'équilibre, la transition allostérique fait passer la protéine réversiblement de l'un à l'autre des états. Lorsque le ligand lie le récepteur, l'équilibre est déplacé vers la forme active du récepteur. La forme R* est le seul état capable d'interagir efficacement avec la protéine G (Lefkowitz *et al.*, 1993).

Les domaines situés dans la partie amino-terminale et carboxy-terminale de la troisième boucle intracellulaire du récepteur jouent un rôle majeur auprès de la protéine G. Des études effectuées chez plusieurs récepteurs couplés à la protéine G montrent en effet que ces domaines possèdent des caractéristiques souvent bien conservées et impliquées dans la liaison à la protéine G (figure 5) (Liu *et al.*, 1995; Malek *et al.*, 1993; Cotecchia *et al.*, 1992; Cheung *et al.*, 1991 et 1992; Okamoto et Nishimoto, 1992; Wess *et al.*, 1992). Des mutations ponctuelles effectuées dans la région carboxy-terminale de la

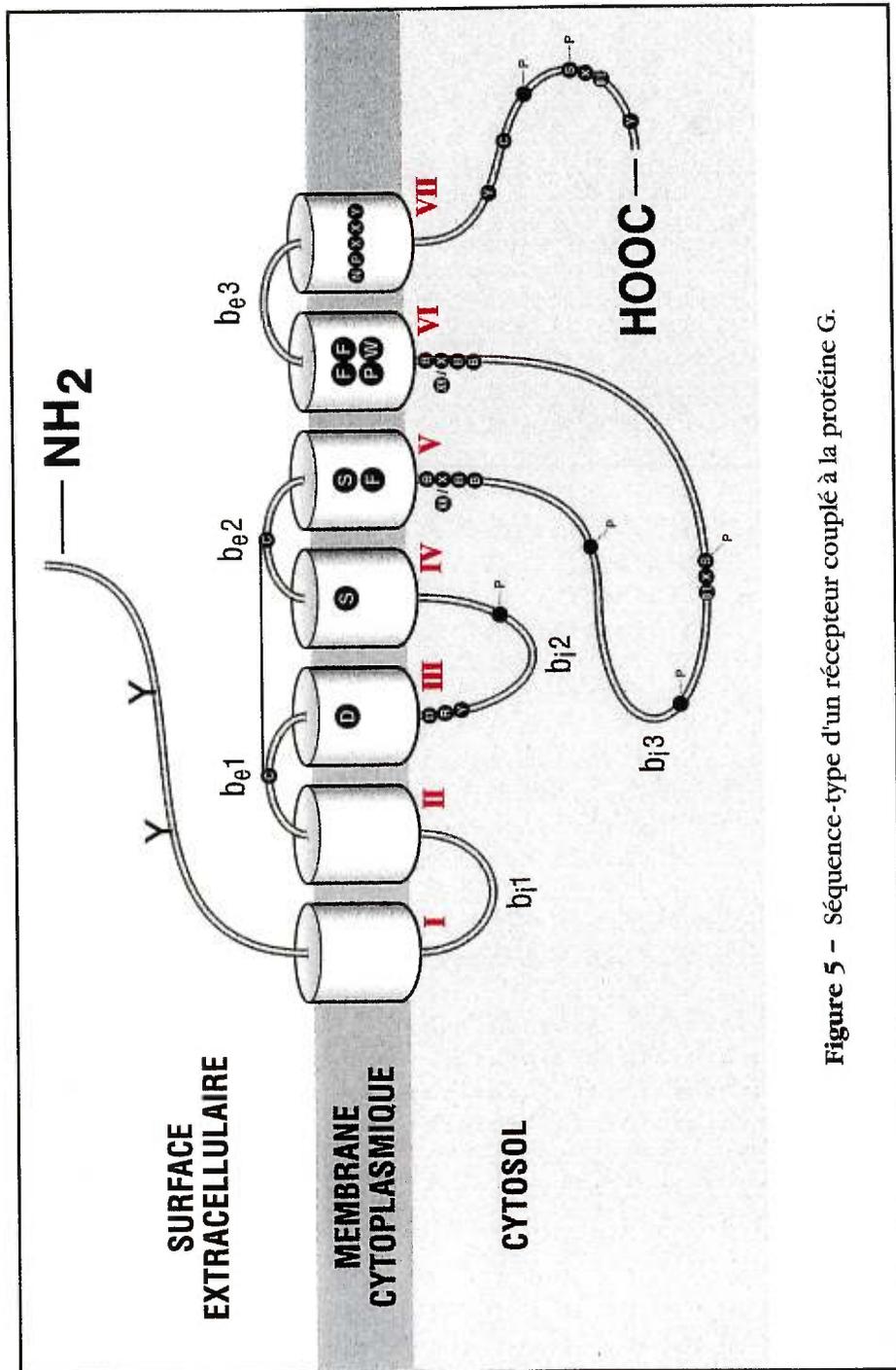


Figure 5 – Séquence-type d'un récepteur couplé à la protéine G.

troisième boucle chez de nombreux récepteurs conduisent le récepteur à un état d'activité permanent, et ce en l'absence d'agoniste. Ces travaux suggèrent que cette région contraint le récepteur à demeurer dans sa condition inactive (R) (Kjelsberg *et al.*, 1992). Le récepteur constitutivement actif offre un modèle idéal pour étudier le mode d'action du récepteur auprès de sa protéine G (Herrick-Davis *et al.*, 1997). Entre autres, on a observé que le couplage du récepteur R* avec la protéine G requiert dans certains cas la présence du motif B-B-X-X-B ou B-B-X-B (où B est un acide aminé basique et X tout autre acide aminé). Certains travaux sont allés plus loin en montrant que des domaines de la troisième boucle sont capables de discrimination envers différentes protéines G et s'y lient de manière spécifique (Wess 90, Lechleiter 90, Blüml 94, Wong *et al.* 1990). Par exemple, le récepteur α_2 -adrénergique qui possède le double système d'activation $G_{\text{inhibitrice}}/G_{\text{stimulatrice}}$ induit l'activation de Gs via sa liaison avec le motif en N-terminal tandis que l'activation de Gi repose vraisemblablement sur des mécanismes impliquant d'autres domaines du récepteur (Eason *et al.* 1995). Le motif en N-terminal de la troisième boucle intracellulaire n'est donc pas l'unique site impliqué dans l'activation de la protéine G. Par exemple, on sait que le récepteur β -2-adrénergique combine de multiples domaines intracellulaires pour activer Gs (Liggett *et al.*, 1991; O'Dowd 1988, Cheung *et al.*, 1991 et 1992).

1.6.4 Le motif DRY - la deuxième boucle intracellulaire

Le motif DRY est situé en N-terminal de la deuxième boucle cytoplasmique à la limite du segment transmembranaire III (figure 5). Ce triplet d'acides aminés, omniprésent chez les récepteurs couplés à la protéine G est, à l'occasion, modifié par des substitutions qui touchent dans la plupart des cas les résidus Asp et Tyr (Arora *et al.*,

1995 ; Probst *et al.*, 1992). Plusieurs études, souvent contradictoires, suggèrent que ce motif participe à la liaison du récepteur à la protéine G ainsi qu'à l'internalisation du récepteur (Arora *et al.*, 1997) .

1.6.5 Le lien disulfure intramoléculaire

Les récepteurs couplés à la protéine G possèdent une paire de cystéine très bien conservée située dans les première et deuxième boucles extracellulaires (figure 5). Ces résidues sont réunis par un lien covalent disulfure qui confère au récepteur une stabilité structurelle sans laquelle il ne pourrait lier le ligand et activer sa voie intracellulaire (Cook et Eidne, 1997). Des cystéines retrouvées dans la troisième boucle extracellulaire forment parfois des ponts disulfures avec les autres régions extracellulaires du récepteur. La stabilité du récepteur se voit alors accrue par un lien disulfure supplémentaire favorisant ainsi l'entrée du ligand dans la pochette de liaison (Noda *et al.*, 1994).

1.6.6 Les sites de glycosylation

Le poids moléculaire d'une séquence en acides aminés déduite à partir de l'ADNc d'un récepteur cloné est toujours moindre que celui du récepteur sauvage évalué par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. La glycosylation du récepteur sauvage en est la cause. Par exemple, le récepteur β 2-adrénergique qui contient 2 sites de glycosylation voit sa masse accrue de 25 à 30% par cette seule modification post-traductionnelle. La glycosylation est effectuée dans le réticulum endoplasmique sur les résidus asparagine cibles qui sont ceux des séquences Asn-X-Ser/Thr où X est un acide aminé quelconque. Le polysaccharide est retrouvé dans les régions du récepteur exposées

au milieu environnant, le plus souvent sur la queue amino-terminale (figure 5). Le rôle joué par cette modification n'est pas clairement établi. Toutefois on sait que l'absence de glycosylation ne nuit ni à la liaison du ligand au récepteur ni à son interaction avec la protéine G. Il a été proposé que la présence de polysaccharide sur le récepteur contribue à le stabiliser et l'orienter correctement dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire (Barnes, 1995).

2. MATÉRIEL et MÉTHODE

Avant d'aborder le protocole utilisé pour arriver à la détermination de la séquence du récepteur à la sérotonine chez l'aplysie, quelques techniques générales qui ont cours en biologie moléculaire seront décrites.

2.1.1 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Un seul exemplaire d'une copie d'ADN peut être répliqué en quantités de l'ordre du microgramme par la technique du PCR et ce, entièrement *in vitro*. L'amplification est réalisée à l'aide d'une ADN polymérase et de deux amorces oligonucléotides complémentaires de chacune des extrémités 3' du duplex à amplifier. Le but du PCR est d'amplifier chaque brin d'un duplex d'ADN à l'aide de la polymérase. Ainsi, au premier cycle d'amplification il y aura 2 duplex d'ADN de produits dont chacun des brins sera à son tour dupliqué au second cycle pour produire 4 duplex identiques. Les cycles d'amplification se succéderont et à chaque fois doubleront la quantité de duplex d'ADN présents au cycle précédent (fig. 6). En règle générale, l'amplification PCR est programmée pour effectuer de 35 à 40 cycles. Le cycle se réalise en trois temps. Après l'appariement des amorces avec l'ADN dénaturé, la polymérase synthétise à l'aide des désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) les nouveaux brins formant ainsi de nouveaux duplex. Le passage au cycle suivant requiert la dénaturation du duplex d'ADN afin de rendre les brins libres de s'associer avec les amorces. L'enzyme utilisée provient d'une bactérie thermophile, le plus souvent isolée de la souche *Thermus aquaticus*. Son optimum d'activité est à 72°C et elle résiste à des températures se rapprochant des 100°C. La technique du PCR tire profit de la thermostabilité de l'enzyme

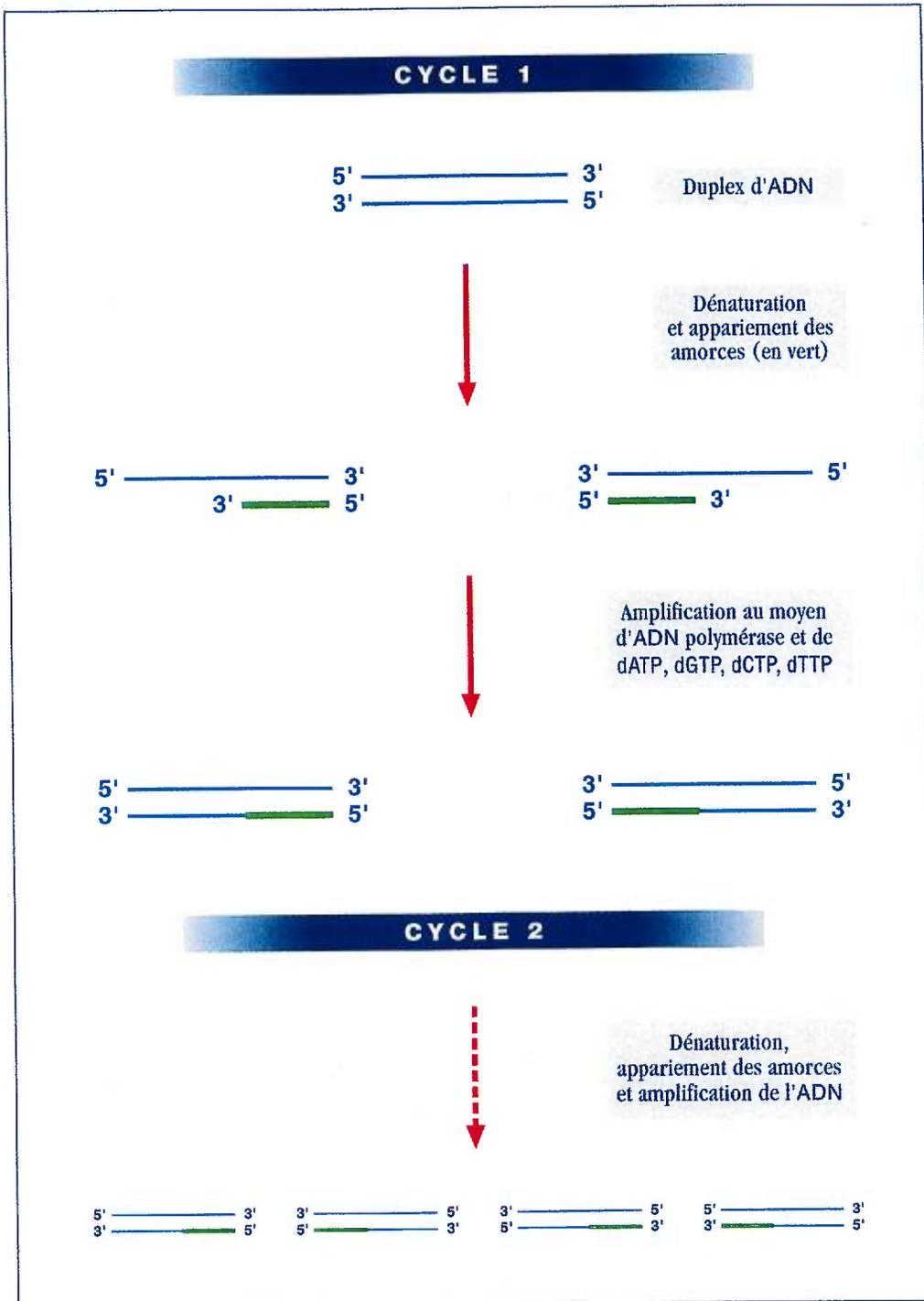


Figure 6 – Description schématisée de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Cette réaction amplifie un segment d'ADN dans un vaste mélange de chaînes d'ADN. À chaque cycle, la quantité de l'ADN double. Après quelques cycles, les duplex qui représentent le segment choisi prédominent.

de deux façons. À la température de synthèse (72°C) l'appariement des bases entre les amorces et l'ADN est plus spécifique qu'à 37°C, la température optimale de l'ADN polymérase de *E. coli*. De plus, la température de dénaturation (95°C) des duplex d'ADN ne nuisant pas à l'intégrité de l'enzyme, elle permet de réaliser des cycles multiples après une addition unique d'enzyme. Pour pouvoir appliquer la méthode, le PCR exige une connaissance préalable des séquences à amplifier. Toutefois, un gène dont la séquence est inconnue peut être amplifié en tirant partie des similarités de séquence qui existent entre des gènes appartenant à une même famille. Pour que l'amorce déduite à partir des séquences connues de gènes appartenant à une même famille de gènes puisse avoir suffisamment de similarité avec le brin complémentaire du gène à amplifier, l'oligonucléotide qui sert d'amorce sera dégénéré. La dégénérescence du code génétique offre la possibilité de synthétiser un mélange d'amorces comportant différentes bases à certaines positions. Ainsi, les chances d'appariement d'une amorce au brin de séquence inconnu sont accrues par le fait qu'il existe dans le mélange d'amorces un oligonucléotide dont la séquence présente une plus grande complémentarité avec l'ADN à amplifier, sans jamais cependant lui ressembler tout à fait.

2.1.2 La construction d'ADN recombinant

Le recombinant est construit par ligature d'un insert dans un vecteur. Les inserts peuvent être une population d'ADN pur tel que celle produite lors d'une amplification PCR ou bien un vaste mélange d'inserts différents comme celui utilisé pour la construction de banques d'ADN complémentaire ou de banques d'ADN génomique. Tout petit génome extrachromosomique est, en principe, un vecteur potentiel. Les plasmides bactériens et les phages d'*E. coli* sont les systèmes vectoriels les plus couramment

utilisés. Les vecteurs plasmidiques sont des ADN circulaires, le plus souvent à double brin, qui contiennent un contrôle de réplication, des marqueurs sélectionnables (sites de résistance à des antibiotiques) et un site de reconnaissance aux endonucléases qui sert à linéariser le vecteur en vue de sa ligation à l'insert. Lorsque la taille des inserts est importante ou que la population d'ADN à cribler est grande, l'utilisation de vecteurs phagiques est plus appropriée. Les dérivés des phages tempérés λ sont les vecteurs phagiques les plus communément utilisés. Un des avantages qu'ils présentent pour le clonage moléculaire est l'efficacité du transfert des génomes recombinants dans les cellules d'*E. coli*. Contrairement au mode de transfert utilisé par les recombinants plasmidiques où l'ADN étranger est transfecté directement à travers la membrane de la cellule-hôte, le transfert des recombinants λ dans les bactéries s'effectue par infection *via* des phages. Les λ vecteurs recombinants doivent en effet être encapsidés dans des particules de phage pour pouvoir être un outil valable de clonage.

2.1.3 Le clonage des ADN recombinants

Un clone de virus ou de cellule est une population d'individus issus respectivement de la reproduction d'un seul virion ou d'une seule cellule. Afin de sélectionner les clones, il faut être en mesure de séparer les cellules non transfectées de celles qui le sont. Dans le cas de vecteur plasmidique, les bactéries transfectées sont étalées sur des boîtes d'agar nutritif auquel on ajoute un antibiotique qui permet d'éliminer les bactéries qui n'ont pas intégré de plasmide. Le marqueur de sélection retrouvé sur le plasmide octroie en effet à la bactérie transfectée une résistance à un antibiotique particulier, présent dans le milieu. Ainsi, la bactérie transfectée formera une colonie dont chacun de ses membres sera porteur d'une même molécule d'ADN

recombinant. Contrairement à la situation qui prévaut dans le cas de vecteurs plasmidiques, où ce sont les bactéries qui sont clonées et sélectionnées, l'ADN recombinant du phage est cloné sous forme de plaque de lyse. Après l'infection de cellules avec une population de bactériophages recombinants, les cellules infectées sont étalées sur un tapis de cellule-hôtes dans des boîtes d'agar. Chaque cellule infectée éventuellement lyse, et les virions libérés infectent à leur tour les cellule-hôtes environnantes. L'apparition d'une zone claire sur le tapis de cellules est appelée plaque de lyse. Chaque plaque de lyse qui apparaît sur les boîtes d'agar sont autant de clones phagiques susceptibles de contenir le recombinant recherché.

2.1.4 La sélection de l'ADN recombinant

La première exigence à satisfaire dans un clonage est de séparer l'ensemble des cellules transfectées ou infectées de celles qui ne le sont pas. La méthode utilisée pour identifier le clone recherché d'une population de phage ou de bactérie consiste à cribler la collection de clones étalés sur les boîtes d'agar à l'aide d'un polynucléotide complémentaire en guise de sonde. La préparation de la sonde implique l'incorporation au polynucléotide d'un marqueur radioactif, le plus souvent l'isotope ^{32}P ou un marqueur non-radioactif tel que le digoxigénine. Le marquage peut être fait par l'ajout d'une queue à l'extrémité 3' du polynucléotide au moyen d'une transférase ou encore par synthèse d'un nouveau brin avec une polymérase en présence pour chacun des cas de substrats désoxyribonucléotides triphosphates marqués soit par un atome de ^{32}P en position α ou encore en utilisant des nucléotides liés à un marqueur non-radioactif.

Avant de procéder à l'hybridation des clones avec la sonde, on transfère les colonies de bactéries ou les plages de lyse par réplique sur une mince feuille de nitrocellulose ou de nylon (fig. 7). La séparation des brins d'ADN est nécessaire pour l'hybridation des ADN recombinants avec la sonde complémentaire. La membrane est donc traitée au moyen d'un alkali pour dénaturer l'ADN avant d'être incubée dans une solution contenant la sonde marquée dans des conditions de concentration saline et de température qui stabilisent les liaisons hydrogène qui se forment entre la sonde et les fragments d'ADN complémentaires. Les clones qui hybrident avec la sonde peuvent être visualisés par autoradiographie ou directement sur la membrane par une réaction colorimétrique comme on en utilise lors de marquages effectués au moyen de l'haptène digoxigénine. Après l'hybridation et l'identification des plages désirées, les clones sont récupérés à partir des plages subsistant sur les boîtes de gélose.

2.2 Le projet: travaux préliminaires

A l'aide de deux amorces dégénérées, une amplification par PCR a permis d'obtenir un fragment de 175 pb présentant des homologies de séquences avec la famille des récepteurs sérotoninergiques. Les amorces #2750 et #2754 correspondant aux régions transmembranaires TM6 et TM7 respectivement ont été déduites en tirant partie des homologies de séquences existant parmi 4 récepteurs sérotoninergiques connus d'invertébrés et un 5-HT1A de vertébré. Le segment amplifié, que nous appellerons TM6-TM7, provient d'une banque d'ADNc de rein d'aplysie préparées dans le vecteur phagique lgt10. La similarité que le fragment TM6-TM7 partage avec le récepteur à la sérotonine du mollusque *Lymnaea*, sans toutefois ressembler aux deux séquences des récepteurs à la sérotonine connues de l'aplysie, furent une incitation à poursuivre le

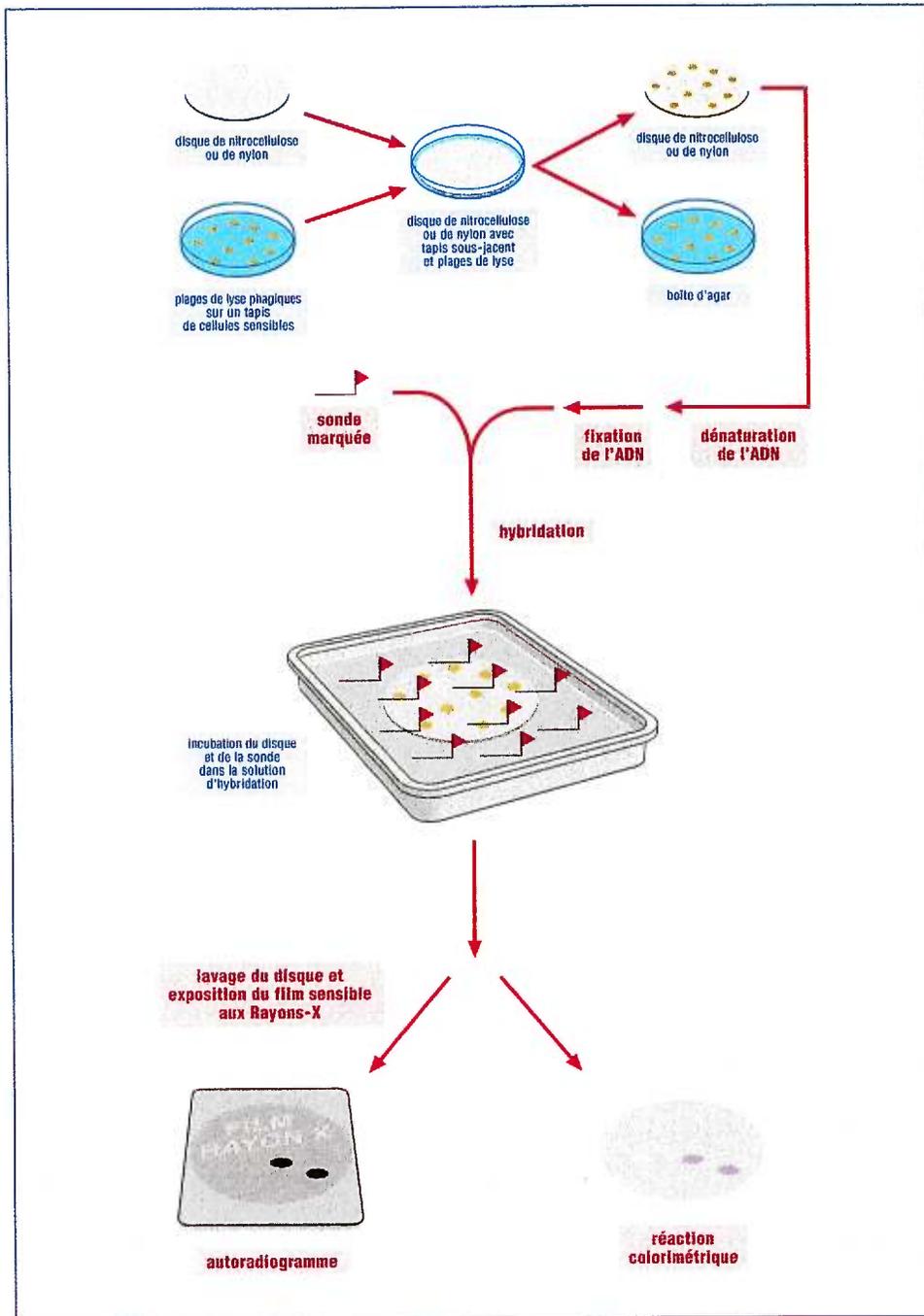


Figure 7 -
 Criblage de plages recombinantes par hybridation avec une sonde spécifique marquée.
 Parmi les dix plages montrées, deux contiennent le segment désiré.

travail. Deux éléments se posent comme le point de départ du projet. De un, la banque de rein contient au moins un recombinant dont l'ADNc code pour un récepteur et de deux, le fragment TM6-TM7 s'avère être un premier outil qui peut être utilisé comme une sonde spécifique pour aller chercher ce qui reste de la séquence à élucider.

2.2.1 Le fractionnement de la banque

Afin de diminuer la population d'ADN recombinant à cribler, on tente d'isoler le clone recherché en constituant des sous-populations provenant de la banque de rein. Ces sous-populations sont des fractions de la banque qui contiennent 2×10^4 pfu soit 6 fois moins de recombinants que peut en contenir la banque. Seules les fractions qui génèrent par PCR le fragment TM6-TM7 à l'aide des amorces #2750 et #2754 passent au crible. La méthode utilisée est celle de Israel (1993) et suit la procédure suivante: Une infection est faite avec 500 μ l de bactéries L392 en phase de croissance exponentielle (OD_{600} 0.4), 500 μ l de milieu SM et 20 μ l de phages (4×10^6 pfu). Les bactéries sont incubées en présence des phages durant 20 min à 37°C après quoi la culture est diluée dans 20 ml de milieu NZCYM. La culture est ensuite répartie dans les 64 puits d'une plaque de 96 puits MICROTEST III (Falcon 3072) à raison de 100 μ l ou 2×10^4 pfu par puits (fig. 8). La plaque scellée est gardée à 37°C durant environ 6 heures avec une agitation vigoureuse. Cette dernière incubation étant terminée, des fractions de 25 μ l par puits sont récoltées. Les fractions sont regroupées selon leur appartenance à une même colonne ou à une même rangée. Ainsi, nous obtenons autant d'échantillons qu'il y a de colonnes (8) et de rangées (8), soit 16 échantillons au total.

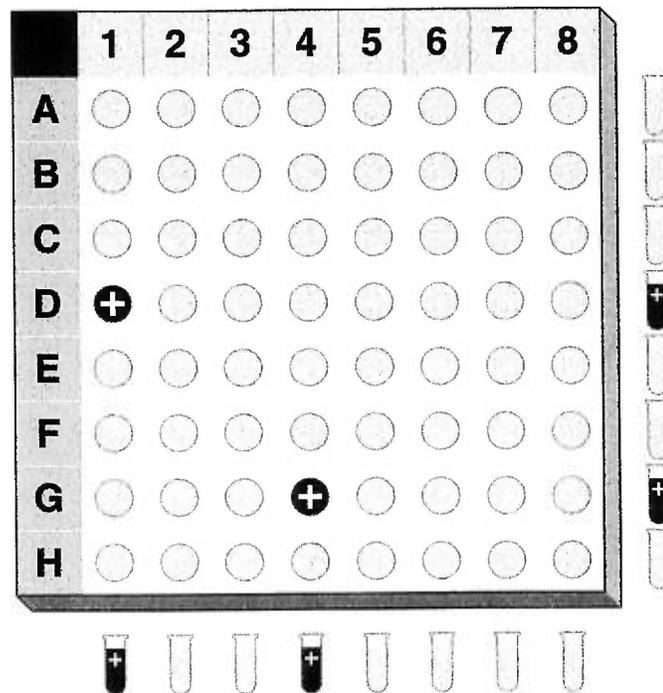


Figure 8 - Fractionnement de la banque et criblage par PCR.

Une dilution de bactéries infectées par des phages recombinants est répartie dans les 64 puits d'une plaque MICROTEST III, à raison de $100 \mu\text{l} / 2 \times 10^4$ pfu par puits. Après la lyse, les fractions sont regroupées selon leur appartenance à une même colonne ou / et à une même rangée. Un criblage par PCR permet d'identifier les puits qui contiennent le recombinant recherché.

2.2.2 Le criblage des échantillons au moyen de la réaction PCR

Une fraction de 0.5 µl de chacun des 16 échantillons est utilisée pour chaque réaction de PCR. Le mélange réactionnel comprend, dans un tampon fourni avec l'enzyme, les oligonucléotides #2750 et 2754 (200 ng de chacun), les 4 dNTP (1 mM de chacun) et 1 unité de Taq polymérase (Pharmacia). Les conditions d'amplification sont les suivantes: dénaturation, 94°C x 1.5 min; appariement des amorces 40°C x 2 min; amplification 72°C x 1 min suivie de 5 secondes supplémentaires ajoutées à chaque cycle et ce pour les 40 cycles de l'amplification. Les produits de l'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1%) dans le but d'y retrouver la bande TM6-TM7 de 175 pb. Afin de s'assurer que les bandes présentes sur le gel soient bien le produit attendu, un transfert du gel par capillarité en condition alcaline est effectué sur une membrane de nylon Zeta-Probe (Bio-Rad) (Maniatis *et al.* 1989). La membrane est hybridée avec la sonde TM6-TM7 rendue radioactive puis exposée durant 12 heures contre un film sensible aux rayons X (fig. 9). L'amplification a généré la bande de 175 pb attendue dans les échantillons de la colonne 4 et de la rangée G. Le puits G4, qui correspond au point où se rencontre la rangée G et la colonne 4, contient un ou des ADNc du récepteur recherché.

2.2.3 L'isolation du recombinant recherché

L'amplification par PCR d'une fraction provenant du puits G4 à l'aide des amorces #2750 et #2754 produit le fragment TM6-TM7. Le recombinant recherché se trouvant parmi la population du puits G4, deux amplifications PCR sont effectuées avec les amorces #2750 et #2754 et leur paire respective, les amorces oligonucléotidiques

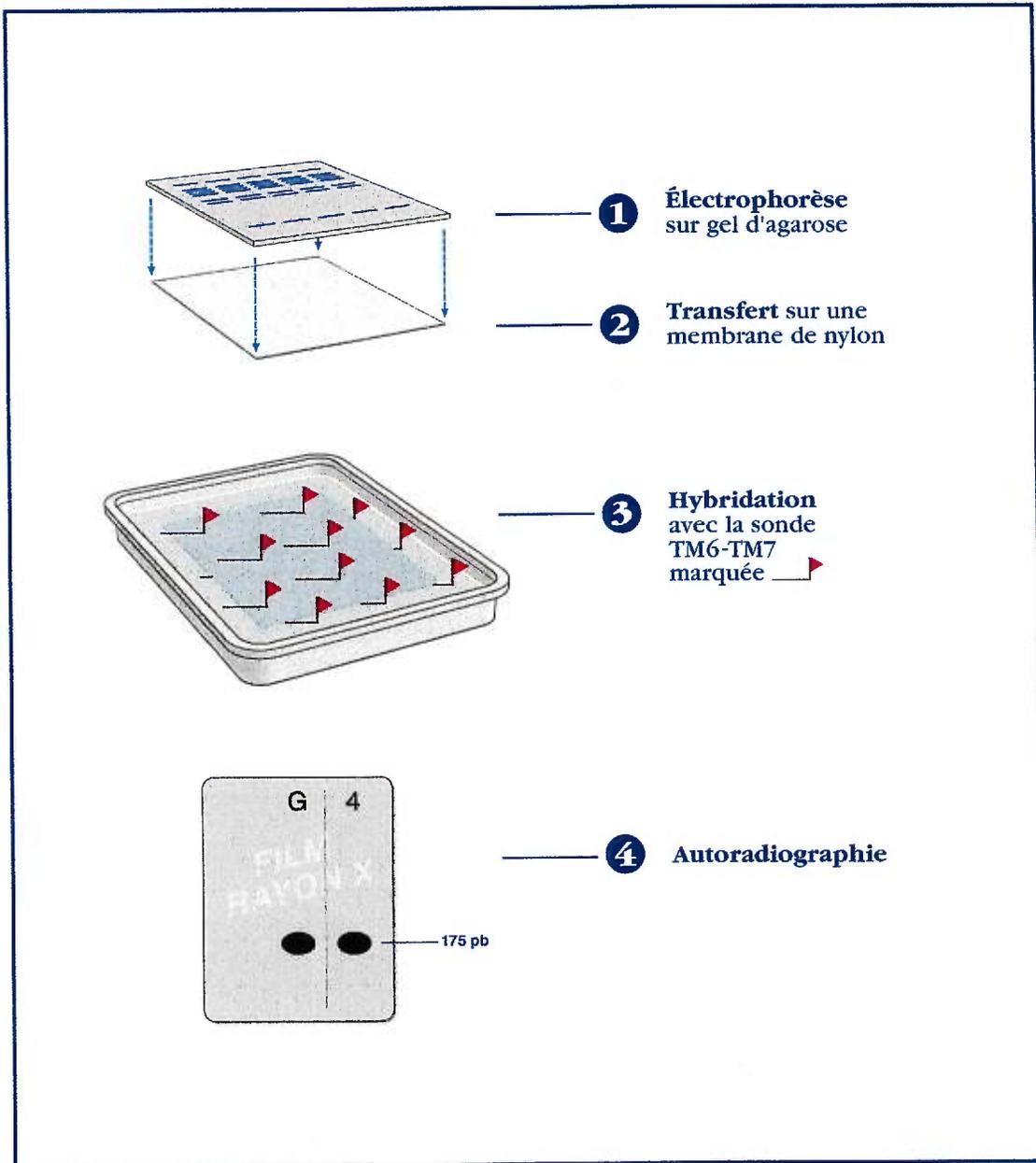


Figure 9 -
 Procédure de séparation, de marquage et de révélation
 des produits d'amplification PCR.
 (voir texte pour la description détaillée)

#1893 et #1894 qui s'apparient au vecteur phagique. Seule la paire d'amorces #2754 / #1894 amplifie un fragment significatif de 1.5 Kb ce qui suggère que le recombinant est constitué de la région 5' du gène. C'est cette région qui nous intéresse puisqu'elle contient la région du gène qui couvre la section correspondant au TM VII - TM I du récepteur. La migration électrophorétique du produit de PCR sur un gel d'agarose 1% suivie d'un transfert alcalin sur une membrane de nylon permet de vérifier, par hybridation de la membrane avec la sonde TM6-TM7 rendue radioactive, que le segment de 1.5 Kb appartient au gène recherché.

2.2.4 Le clonage de l'insert sélectionné

Le produit de 1.5 Kb, amplifié avec la paire d'amorce #2754 / #1894, est cloné dans le vecteur plasmidique pGEM-7Zf au site de restriction EcoR1. Le fragment cloné est appelé G4. La procédure suivante a été adoptée pour cloner G4 dans pGEM: le vecteur plasmidique est linéarisé avec EcoR1 et purifié sur un support après avoir migré sur un gel d'agarose 1%. Le produit d'amplification de 1.5 Kb est purifié selon la même méthode. La ligation de l'insert dans le vecteur est effectuée à l'aide de 20 unités d'ADN ligase T4. La réaction est maintenue à 15°C durant 20 heures après quoi l'enzyme est dénaturée par la chaleur. Le plasmide recombinant est inséré dans des bactéries *E. coli* rendues compétentes grâce à un traitement dans une solution riche en ions divalents et monovalents (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Rb^{+}) (Hanahan 1983). Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes d'agar en présence de l'inducteur isopropyle- β -D-thiogalactoside (IPTG) et du substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal). Les boîtes d'agar sont incubées à 37°C durant 12 heures après quoi les colonies positives, c'est-à-dire celles qui contiennent un plasmide recombinant, sont mises en milieu liquide

à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne un niveau de croissance en phase exponentielle. Les colonies positives sont distinguées des colonies négatives par leur couleur blanche, celles transfectées par des plasmides ne contenant pas d'inserts ont une couleur bleu. Lorsque la culture liquide est suffisamment enrichie, les bactéries sont lysées et les plasmides libérés sont nettoyés des débris bactériens (Maniatis *et al.*, 1989). Les plasmides ainsi purifiés sont prêts pour le séquençage.

2.2.5 Le séquençage de l'insert

L'insert de 1.5 Kb cloné dans pGEM est séquençé à l'aide d'un kit de séquençage enzymatique T7 (Pharmacia). La figure 10 décrit les étapes qui ont mené au séquençage du fragment G4. Les amorces forward (F) et reverse (R) sont celles qui s'apparient au vecteur tandis que les amorces numérotées ont été synthétisées pour s'apparier à l'insert. Les sites de restriction indiquent les positions des deux fragments sous-clonés soit le fragment ClaI-SphI et le fragment BamHI-HindIII. Chaque fragment sous-cloné dans pGEM est séquençé au moyen des amorces vectorielles R et F. Lors de l'excision du fragment ClaI-SphI ou BamHI-HindIII, le vecteur est ligaturé de nouveau avec son restant d'insert puis séquençé. Au site de restriction ClaI on remarquera que la région 5', correspondant au domaine TM IV de la protéine, est séquençée à l'aide de l'amorce R. La même procédure est appliquée aux sites SphI et Hind III pour séquençer la région 3' du gène. Les résultats du séquençage sont vérifiés en répétant l'opération au moyen d'amorces spécifiques à l'insert. À la suite du séquençage de G4 on confirme, à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que le fragment présente des homologies de séquences avec la famille de gène codant pour les récepteurs sérotoninergiques. La prochaine étape consiste à déterminer la région 5' restante du gène.

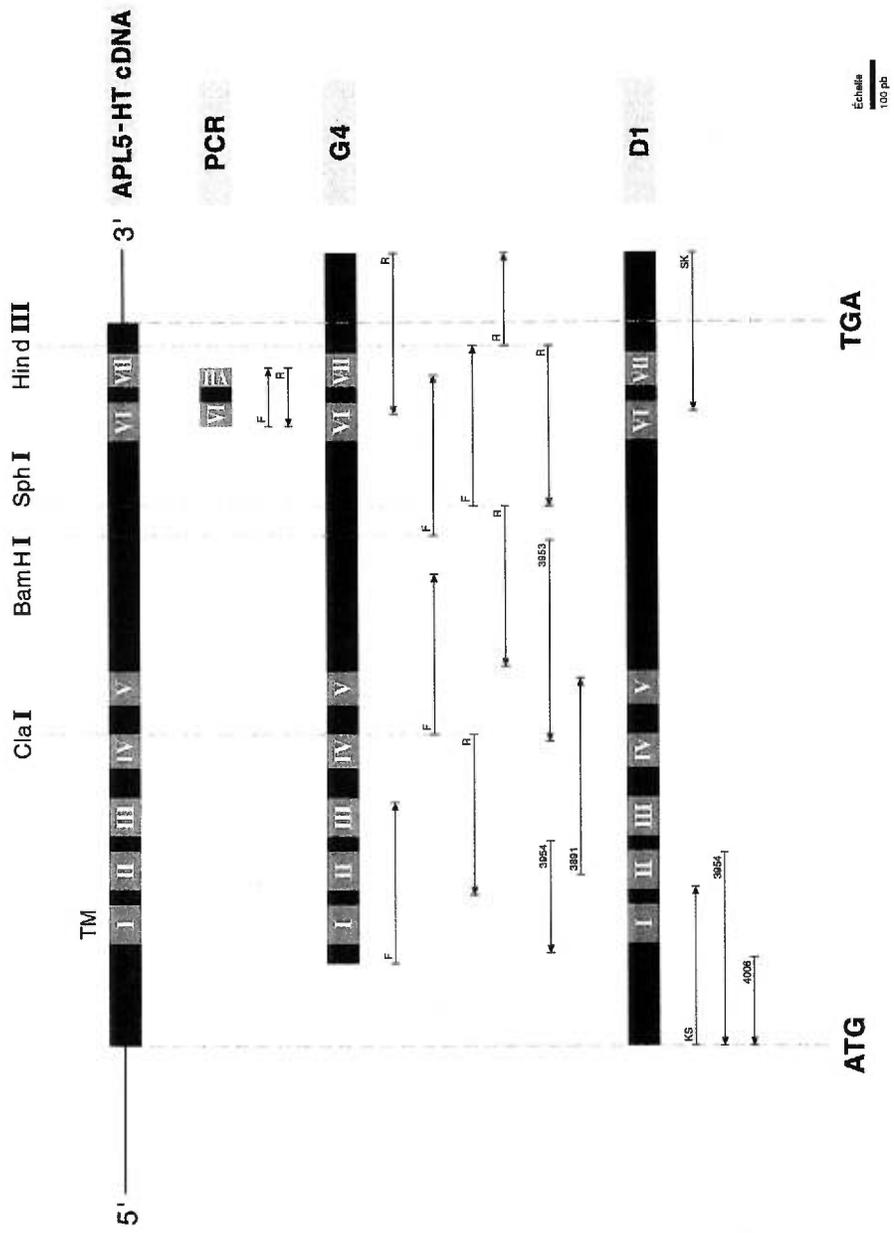


Figure 10 – Stratégie adoptée pour séquencer le gène APL5-HT.

2.2.6 Second criblage de la banque avec le fragment G4 marqué

Le fragment G4 est ensuite utilisé comme sonde pour cribler le puits D1. Le puits D1 de la plaque MICROTTEST avait aussi généré le fragment TM6-TM7 lors de l'amplification PCR avec les amorces #2750 et #2754 (fig. 8). Un premier criblage, sur des disques de nylon, à l'aide du fragment G4 marqué en 3' avec la digoxigénine (#1417 231, Boehringer Mannheim) permet d'isoler 21 plaques en duplicata. Trois de ces plaques sont isolées pour y faire un deuxième criblage avec une sonde EcoR1- Sph1 provenant d'une digestion du fragment G4. Des deux fragments résultant de cette digestion, seule la sonde de 900pb correspondant à la région 5' du fragment G4 est utilisée. Une plaque nommée D1 est isolée, ses phages sont multipliés et les vecteurs recombinant sont isolés puis digérés avec EcoR1. Un insert de 1.6 Kb est séparé sur un gel d'agarose 1% et cloné dans le plasmide bluescript SK. À la figure 10, on peut suivre les étapes de séquençage de la région 5' du recombinant D1. Une amorce du vecteur SK (l'amorce KS) et 2 amorces spécifiques à l'insert ont suffi pour déterminer le reste de la séquence.

3. RÉSULTATS et DISCUSSION

La séquence d'un nouveau récepteur sérotoninergique a été déterminée chez *Aplysia californica*. Le profil d'hydrophobicité établi selon l'analyse de Kyte et Doolittle (1982) suggère que la séquence de 492 acides aminés contient les sept régions transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés à la protéine G. Selon la recherche effectuée au moyen de l'algorithme de BLAST à NCBI, la séquence de l'aplysie présente les similarités les plus significatives avec celles des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT1 (Altschul *et al.* 1990). Lorsque l'on compare les séquences de récepteurs d'invertébrés avec celles de vertébrés on constate que, dans tout les cas, les récepteurs à la sérotonine chez les invertébrés ressemblent avant tout aux récepteurs vertébrés de type 5-HT1. Toutefois, les récepteurs d'invertébrés affichent des caractéristiques pharmacologiques distinctes qui ne permettent pas de les associer à un récepteur vertébré particulier.

3.1.1 L'identification de la nouvelle séquence

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible au NCBI (National Center for Biotechnology Information), est un programme d'analyse de séquence qui permet d'aller chercher dans les banques de la NCBI des séquences nucléotidiques ou des séquences peptidiques présentant des similarités avec une séquence quelconque. L'algorithme utilisé établit une comparaison entre la séquence soumise et l'ensemble des séquences disponibles dans la banques (1.6 million). L'opération consiste à traiter non pas la séquence dans sa totalité mais des segments de celle-ci, choisis parce qu'ils partagent une plus forte homologie avec des portions correspondantes de séquences de la

banque. Seules les régions similaires sont extraites et présentées sous forme d'un alignement de la séquence soumise avec celle de la banque. À moins d'avoir une séquence présentant une ressemblance marquée avec une séquence de la banque, il est plutôt rare d'obtenir une analyse de comparaison portant sur le gène ou la protéine dans son entier. En raison de la dégénérescence du code génétique, la recherche pour l'analyse de similarité au moyen de BLAST est de préférence effectuée à l'aide des séquences nucléotidiques. La séquence nucléotidique du récepteur APL5-HT est présentée à la figure 11 accompagnée de sa séquence traduite en acides aminés. L'alignement présenté à la figure 12 a été obtenu en utilisant le programme pileup sur le GCG (Genetic Computer Group). Pour des raisons pratiques, les résultats sont présentés en utilisant les séquences déduites en acides aminés. Ces séquences sont choisies à partir de la sélection faite par BLAST. Les 6 séquences qui présentent les plus fortes homologues avec le récepteur de l'aplysie sont les récepteurs à la sérotonine de la famille 5-HT1 que voici, accompagnées du pourcentage de similarité calculé pour les polypeptides : le 5-HT_{lym} du mollusque *Lymnaea stagnalis* (48%) (Sugamori *et al.* 1993), le 5-HT2A_{dro} de la drosophile (36%), le 5-HT2B_{dro} de la drosophile (34%) (Saudou *et al.*, 1992), le 5-HT1B_{souris} de *M.musculus* (55%) (Maroteaux *et al.*, 1992) et le 5-HT_{bombyx} du vers à soie (52%) (von Nickisch-Roseneck *et al.*, 1996). Quoique BLAST met en tête le récepteur de *Lymnaea* comme candidat partageant la similarité la plus forte avec le récepteur de l'aplysie, on remarquera que le pourcentage de similarité ne coïncide pas avec cette observation. On se souviendra que BLAST a fait des comparaisons à partir de segments de gènes, choisis parce qu'ils optimisent l'homologie, délaissant ainsi le reste de la séquence du gène qui ne pourrait que diminuer l'homologie existant entre 2 séquences. Le pourcentage de similarité a été calculé pour des séquences complètes, ce qui a pour effet de minimiser le degré de ressemblance obtenu précédemment au moyen de BLAST. Parmi la centaine de

séquences extraites par BLAST, on retrouve plusieurs récepteurs à la sérotonine de type 1, 2, 5 et 7, mais aussi des récepteurs adrénérgiques et des récepteurs dopaminérgiques. La similarité de séquence du récepteur APL5-HT avec ces derniers récepteurs confirme certaines des observations de Peroutka (1995). Le chercheur constate en effet que les récepteurs à la sérotonine du sous-type 5-HT1 ressemblent davantage aux récepteurs dopaminérgiques, adrénérgiques et muscariniques qu'aux récepteurs sérotoninergiques 5-HT2 et 5-HT6. Ces observations suggèrent que tous les récepteurs aminérgiques trouvent une origine commune en un récepteur primitif de type sérotoninergique.

3.1.2 Hydrophathie de la séquence APL5-HT

La structure primaire d'un polypeptide suffit à déterminer la structure adoptée par la protéine dans l'espace. On trouve environ 75% des acides aminés hydrophobes dans les zones protéiques repliées en hélice, particulièrement parmi les domaines transmembranaires. On constate en effet que les résidus hydrophobes se logent préférentiellement à l'intérieur de la protéine ou de la membrane tandis que les résidus hydrophiles sont exposés au solvant. La disposition des résidus hydrophobes et hydrophiles n'est pas sans conséquence sur la structure de la protéine. Il existe plusieurs échelles d'hydrophathies qui permettent de prédire la structure secondaire d'une protéine. L'une d'entre elle, celle de Kyte et Doolittle (1982) est couramment utilisée pour prédire le profil d'hydrophobicité des protéines membranaires. Chaque chaîne latérale d'acide aminé se voit attribuer une note d'hydrophobicité selon une échelle basée sur des données physico-chimiques ainsi que sur des analyses statistiques portant sur la structure tridimensionnelle des protéines. L'échelle, préinscrite dans un programme informatique, analyse une séquence selon la procédure qui suit. Une fenêtre de 7 positions successives

```

1 ASN THR ARG VAL ILE ARG HIS PRO VAL THR GLN SER HIS THR VAL ALA VAL THR GLU ARG *** PRO THR ARG LEU ASP LEU ARG *** PRO PRO SER 32
1 AAC ACG AGA GTA ATC CGT CAC CCT GTC ACA CAG AGT CAT ACG GTC GCA GTC ACC GAA AGA TGA CCC ACA CGA CTA GAT TTG AGA TAG CCC CCG TCT 96
*
33 LEU PHE PRO THR ALA ALA GLY MET CYS TRP HIS ASN ILE SER VAL GLN ARG MET GLY ARG ASN ALA SER LEU LEU GLU ALA ASN MET TYR ALA MET 64
97 TTG TTT CCA ACA GCA GCG GGG ATG TGC TGG CAT AAC ATT TCG GTA CAG AGG ATG GGA AGA AAC GGT TCG CTA TTG GAA GCC AAT ATG TAC GCC ATG 192
65 PHE PRO GLY TYR ASN ILE THR THR GLY TRP PRO PRO ARG ASP ASN ASN SER ASN ASN SER GLY TYR PHE ASP GLN VAL THR VAL ASN GLY SER ASP 96
193 TTY CCC GGG TAC AAC ATC ACG ACG GGT TGG CCT CCC AGA GAT AAC AAT TCC AAC AAT TCC GGG TAC TTC GAT CAA GTA ACC GTC AAT GGC AGT GAC 288
97 ARG PRO GLU LEU LEU ARG GLN TYR ASN TYR HIS GLU PRO LYS TYR GLU GLU PRO VAL MET ILE VAL ILE CYS ILE PHE LEU GLY CYS MET ILE LEU 128
289 CGG CCT GAA CTG TTG CGA CAG TAT AAC TAC CAT GAA CCT AAA TAT GAA GAG CCT GTG ATG ATT GTC ATA TGT ATC TTT CTA GGA TGC ATG ATC TTA 384
TMI
129 ALA ILE ILE LEU GLY ASN ILE PHE VAL ILE THR ALA ILE LEU VAL GLU LYS SER LEU GLN GLY VAL SER ASN TYR LEU ILE LEU SER LEU ALA VAL 160
385 GCC ATT ATT CTC GGT AAT ATC TTT GTA ATA ACT GCC ATC CTG GTG GAG AAA TCT CTC CAG GGT GTG TCC AAC TAC CTC ATC TTS TCT CTG GCA GTG 480
TMI
161 THR ASP LEU LEU VAL ALA VAL LEU VAL MET PRO LEU SER LEU ILE TYR GLU ILE SER ILE HIS TRP PHE LEU GLY ASN ALA VAL CYS ASP MET TRP 192
481 ACT GAT CTC CTT GTG GCT GTG CTT GTC ATG CCT CTG AGT CTC ATC TAC GAG ATC AGC ATC CAT TGG TTT CTA GGC AAC CCC GTC TGC GAT ATG TGG 576
TMI
193 VAL SER MET ASP VAL LEU CYS CYS THR ALA SER ILE LEU HIS LEU VAL ALA ILE ALA PHE ASP ALA TYR TRP ALA VAL SER ASN ILE ASP TYR VAL 224
577 GTG TCT ATG GAT GTT CTC TGC TGT ACA GCT TCC ATA TTA CAT CTC GTG GCT ATA GGG TTT GAT GCA TAC TGG GCA GTC TCA AAC ATC GAC TAC GTT 672
TMI
225 ARG SER ARG ASN ALA ARG GLN ILE LEU LEU MET VAL ALA ILE VAL TRP THR VAL SER VAL PHE ILE SER ILE SER PRO LEU PHE GLY TRP ARG HIS 256
673 CCG AGT CCG AAT GCA AGG CAG ATT CTT CTG ATG GTG GCC ATC GTG TGG ACC GTG TCA GTG TTT ATA TCG ATA TCC CCT TTG TTC GGT TGG AGA CAT 768
TMI
257 ASP SER ASP ASP PRO GLU LEU THR GLY GLN CYS LEU ILE SER GLN ASP HIS GLY TYR THR VAL PHE SER THR VAL GLY ARG PHE TYR CYS PRO LEU 288
769 GAT TCC GAC GAC CCC GAG CTG ACA GGA CAA TGT CTC ATC TCG CAG GAT CAC GGG TAC ACC GTG TTC TCG ACG GTA GGC CCG TTC TAC TGC CCA CTG 864
TMI
289 LEU LEU MET LEU VAL ILE ASN PHE LYS ILE TYR ARG ALA ALA ARG TYR ARG ILE ARG LYS LYS ARG PHE GLY GLY ARG GLY LYS HIS GLN ALA 320
865 CTG CTG ATG CTT GTG ATC AAC TTT AAG ATA TAT CGC GCA GCT CCG TAC AGA ATA CGA AAG AAA CGC TTC GGT GGA CCG GGA GGG AAA CAT CAA GCG 960
321 LEU HIS VAL PRO LEU PRO ALA VAL THR VAL ASP THR SER HIS ARG GLN ILE LEU ALA THR LEU GLU GLY ASP VAL SER GLN ASP GLY ILE SER MET 352
961 TTA CAC GTT CCG TTA CCG GCT GTA ACG GTC GAC ACG TCA CAT CGA CAA ATA CTC GCA ACT CTC GAA GGT GAC GTA AGC CAG GAC GGC ATC AGC ATG 1056
353 TYR MET PRO SER CYS THR ASN ALA MET THR SER THR ARG VAL GLU HIS GLY GLU THR ALA ARG CYS PRO GLY GLU TRP SER THR ARG ARG PRO ALA 384
1057 TAT ATG CCC TCC TGC ACG AAC GCT ATG ACG TCA ACG CCG GTG GAA CAT GGA GAG ACC GCT AGA TGT CCA GGA GAA TGG TCA ACG CGT CGT CCA GCA 1152
385 GLY SER LYS PRO ASP SER HIS VAL VAL GLN HIS THR ASP ARG PRO SER MET HIS LEU LEU ALA SER PRO TYR PRO VAL GLN GLU PRO ARG SER ARG 416
1153 GGA TCC AAA CCT GAC TCG CAT GTT GTC CAA CAC ACT GAC GGT CCC AGC ATG CAC CTG TTA GCG TCG CCC TAC CCC GTT CAG GAA CCT GGT TCC CCG 1248
TMI
417 PHE GLN GLN GLN ARG HIS GLN LYS THR GLU THR HIS ARG GLN ARG VAL VAL PHE ARG ARG GLU LYS MET GLU MET ALA ARG GLU ARG LYS VAL TRP 448
1249 TTC CAA CAA CAA CAA GGT CAC CAA AAG ACT GAG ACG CAC AGA CAA AGA GTC GTC TTC CCG CGA GAG AAA ATG GAG ATG CCG CGA GAA AGG AAA GTC TGG 1344
TMI
449 LEU ARG VAL LEU GLY ILE ILE THR GLY ALA PHE VAL VAL CYS TRP LEU PRO PHE PHE VAL VAL ALA VAL VAL LYS PRO MET CYS GLY THR PRO CYS 480
1345 CTC ACA CTG TTA GGA ATT ATT ACC GGA CCG TTT GTT GTG TGT TGG CTG CCC TTC TTC GTG GTG GCA GTC GTG AAA CCG ATG TGC GGC ACA CCG TGT 1440
TMI
481 ASP MET PRO SER TYR VAL TYR SER LEU PHE LEU TRP LEU GLY TYR VAL ASN SER LEU ILE ASN PRO ILE ILE TYR THR ILE PHE ASN PRO SER PHE 512
1441 GAC TGT CCT AGC TAC GTG TAC AGT CTC TTC TTG TGG CTC GGC TAC GTT AAT AGC CTC ATC AAT CCC ATC ATT TAC ACC ATC TTC AAC CCA AGC TTC 1536
TMI
513 ARG CYS ALA PHE ASN LYS ILE PHE LEU ARG ARG ILE LYS SER VAL ASN ARG ILE THR ***
1537 CGA TGT GCG TTC AAT AAG ATT TTC TTA CGT CCG ATC AAG TCA GTG AAC CGA ATT ACC TAG TGA CAT GGT CAA TGT TGT CAG TGT ATT GCG CAT GCA 1632
1633 AAT ATT AAT TTC ATG TCA TCT TCA ATC CTA GTA TTG CTA CCA TGT ACT TCC CAT GAC CAA CAG GCA TTT TGT AGT CTA ACA AAT CGA GCA TAT TTT 1728
1729 GTT TAC AAA AAA AAA AAA AAA 3'

```

Figure 11 - Séquence du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie déduite à partir de sa séquence en nucléotides.

Le cadre de lecture de la séquence nucléotidique contient 1476 bases codant pour 492 acides aminés. Le codon putatif initiateur de la traduction est identifié par l'astérisque *. Il correspond à la première méthionine codée par le codon ATG situé en 5'. La présence de 3 autres méthionines situées en aval de la première suggère que la séquence protéique puisse aussi débuter plus tard. Les positions des 7 segments transmembranaires sont indiquées par un trait au dessus de la séquence. À l'extrémité 3' on observe le codon terminateur TAG (***) et la séquence polyadénylique.

cerne une région de la séquence et un calcul de l'hydrophobicité résultante des 7 sites est enregistré. La fenêtre est ensuite déplacée d'un cran et le même calcul est repris. À chaque fois, la fenêtre est déplacée d'un acide aminé de sorte que chaque site intervient 7 fois dans les calculs pendant le passage de la fenêtre. L'indice d'hydrophobicité obtenu pour un acide aminé donné est donc le résultat d'une valeur moyenne prise sur un court segment de longueur invariable. La longueur de la fenêtre peut être modifiée au besoin. Lorsque l'on cherche à prédire les domaines transmembranaires d'un polypeptide, il est indiqué d'utiliser une fenêtre d'une longueur de 7 ou de 9. La figure 13 montre le profil d'hydrophilicité du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie calculé selon l'échelle de Kyte et Doolittle (1982). Les valeurs positives de l'indice d'hydrophilicité représentent les acides aminés polaires tandis que les valeurs négatives caractérisent les résidus non-polaires hydrophobes. Les sommets aux valeurs les plus négatives représentent les domaines transmembranaires de la protéine. Par ailleurs on remarquera que le profil des pics des domaines transmembranaires occupe en moyenne une vingtaine de positions en acides aminés. Il faut en effet un minimum d'environ 20 acides aminés pour qu'une hélice puisse traverser l'épaisseur de la membrane cellulaire. Cette observation devient particulièrement pertinente lorsque l'on cherche à identifier la structure d'une protéine inconnue.

3.1.3 Le modèle de Hibert et le récepteur APL5-HT

Le modèle de Hibert qui illustre le site de reconnaissance du récepteur 5-HT_{2A} du rat et son neurotransmetteur, la sérotonine, peut s'appliquer au récepteur de l'aplysie. Les acides aminés impliqués dans la liaison de l'agoniste sont pour la plupart conservés chez l'aplysie à l'exception du résidu Ala507 du TM V qui est remplacé par un résidu

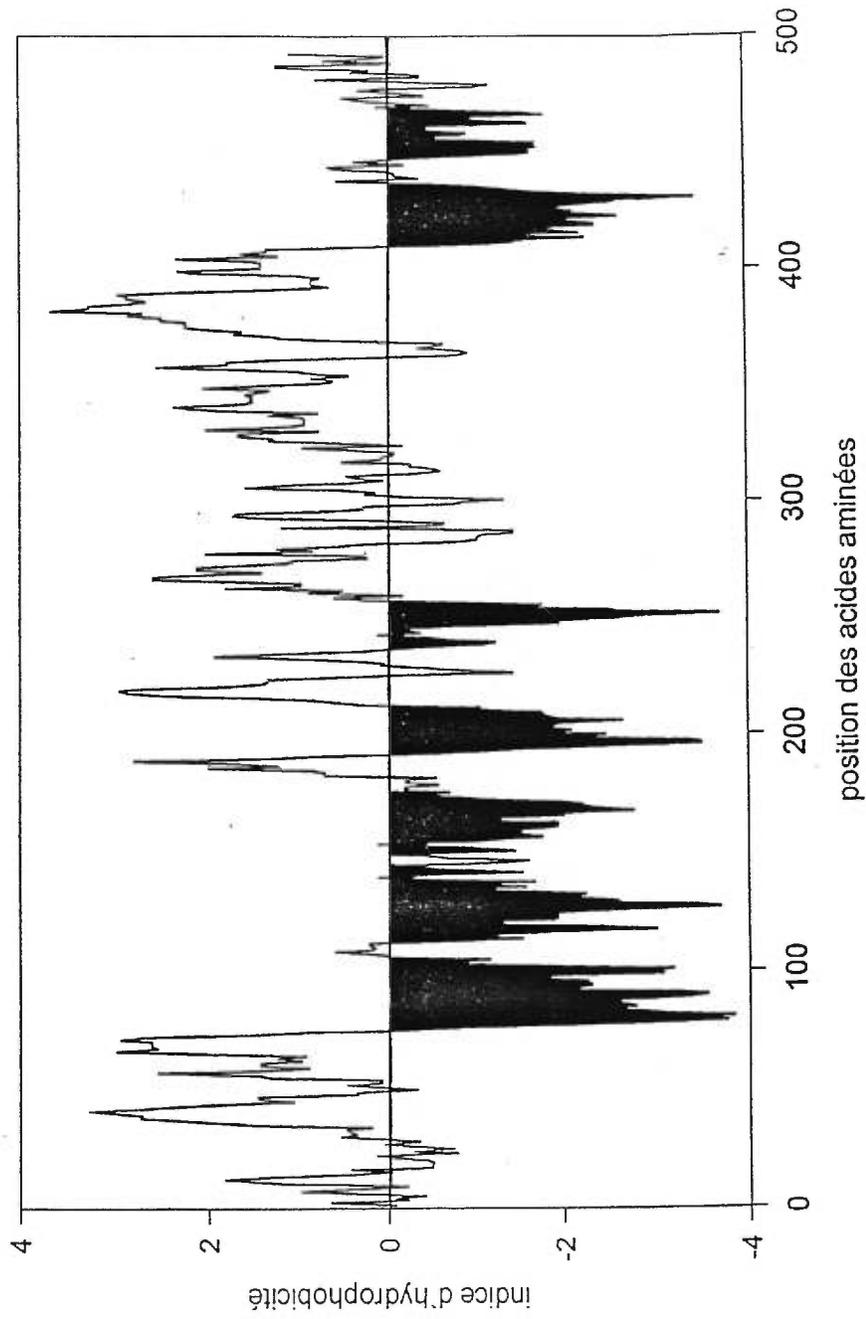


Figure 13 - Profil d'hydrophobicité du récepteur à la sérotonine APL5-HT de l'aplysie.

Le profil d'hydrophobicité est calculé selon l'échelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle (1982). La résultante hydrophile est située au-dessus de la barre du zéro. Les acides aminés non polaires occupent la portion située en-dessous de la barre du zéro. Les sept régions transmembranaires ont été noircies.

glycine (figs. 4 et 12). L'Asp157 de l'aplysie correspond à la position Asp308 dans le TM III du modèle de Hibert (1991). Du point de vue de la thermodynamique, la présence d'un résidu chargé dans une région hydrophobe ne favorise pas l'équilibre du système (Brown, 1990). Pourtant, l'Asp308 qui possède une chaîne latérale acide est présente chez tous les récepteurs aminergiques. La conservation de l'aspartate à cette position est une indication de l'importance qu'elle occupe dans le fonctionnement du récepteur. Des études fonctionnelles faites sur le récepteur 5-HT_{1A} humain modifié par mutagenèse dirigée ont montré que la substitution de Asp308 du TM III diminue l'affinité du récepteur pour la sérotonine sans changer son affinité pour le pindolol (Ho *et al.*, 1992). Ces travaux répétés sur le récepteur 5-HT_{2A} du rat confirment que Asp308 interagit avec l'agoniste mais que contrairement aux résultats précédents, ce site a une influence sur la liaison de l'antagoniste (Wang *et al.*, 1993). D'autres études de mutagenèse ont montré la place importante occupée par ce résidu dans la liaison avec l'antagoniste (Strader *et al.*, 1987; Wang, 1991; Ho *et al.*, 1992). Par ailleurs, la modélisation structurale tridimensionnelle confirme les études empiriques en suggérant la formation d'un lien hydrogène entre le groupe aminé de l'antagoniste et Asp305.

Le récepteur 5-HT_{2A} du rat et celui de l'humain ont des séquences qui présentent un degré élevé d'homologie. Les TM V de ces deux récepteurs seraient en tout point identiques si ce n'était de la position 507, où on y trouve une alanine chez le rat et une sérine chez l'humain. Koa *et al.* (1992) ont montré par des travaux de mutagenèse dirigée que si la sérine du récepteur humain est remplacée par une alanine on obtient un récepteur à la sérotonine humain possédant les caractéristiques pharmacologiques du récepteur de rat. Chez l'aplysie, la position 507 est occupée par une glycine. Ce résidu polaire non chargé possède une chaîne latérale peu encombrante qui ne doit pas modifier

beaucoup plus l'environnement que peut le faire l'alanine. Cependant, entre le résidu Gly507 et le résidu Phe508, le récepteur de l'aplysie possède un résidu supplémentaire, absent chez les 5-HT1A et 5-HT2A. Le résidu en question est une arginine à la chaîne latérale encombrante. La présence d'un tel résidu à cette position ne doit pas être sans conséquence sur l'architecture adoptée par l'hélice alpha du TMV. Il faut prévoir que le comportement pharmacologique du récepteur sera influencé par ces particularités. Hibert et ses collaborateurs nous proposent à travers leur modèle un point de départ stimulant pour aborder le problème de la liaison du ligand à son récepteur. De nouvelles données disponibles raffinent ou modifient notre concept du mode d'action exercé par le ligand sur son récepteur. Les segments transmembranaires II et VII du récepteur 5-HT1A humain, par exemple, possèdent des résidus jouant un rôle important dans l'activation du récepteur par l'agoniste 8-hydroxy-2(di-n-propylamino)tétraline. Ces résidus en questions sont une aspartate située dans le TMII ainsi qu'une asparagine et une sérine présentent dans le TMVII (Chanda *et al.*, 1993). Le récepteur de l'aplysie possède aussi ces résidus. Cependant, il est encore trop tôt pour prédire le profil pharmacologique d'un récepteur à partir de la connaissance de sa séquence primaire seule.

3.1.4 Le motif DRY du récepteur APL5-HT

Le motif DRY est conservé chez l'aplysie comme il l'est chez la plupart des récepteurs couplés à la protéine G. À moins d'avoir des mutants, l'arginine (position 2) de ce motif est toujours conservée. Les mutations observées à ce site conduisent à une diminution de l'activité des récepteurs et mène à la maladie les porteurs de cette anomalie (Bichet *et al.*, 1993; Rosenthal *et al.*, 1993 et Zvyaga *et al.*, 1993). Lorsque l'arginine à la position 2 est remplacée par un autre résidu, les récepteurs muscariniques m1 et m2 ne

sont plus capables de lier la protéine G (Zhu *et al.*, 1994;). Cette même mutation ponctuelle effectuée sur le récepteur peptidique N-formyl empêche non seulement la liaison du ligand mais aussi la mobilisation du calcium (Prossnitz *et al.*, 1995). Habituellement, les substitutions par d'autres acides aminés sont observées aux positions 1 et 3 (Arora *et al.*, 1995; Probst *et al.*, 1992). Dans 83% des cas, la position 1 est conservée. Si un changement advient c'est, dans la grande majorité des cas, pour faire place à un résidu similaire à l'aspartate, le glutamate. La position 3 demeure dans 84% des cas inchangée. Cependant, le résidu remplacé est de type plus varié que celui substitué à la position 1 (Van Rhee et Jacobson, 1996).

3.1.5 Le motif NPXXY du récepteur APL5-HT

Le motif Asn-Pro-X-X-Tyr fréquemment conservé parmi les membres de la famille des récepteurs couplés à la protéine G est présent dans la séquence de l'aplysie. Chez le récepteur β -2-adrénergique, la substitution de la tyrosine de ce motif par Ala empêche la séquestration du récepteur, réduit la phosphorylation par β ARK1 du récepteur activé et nuit à l'activation de l'adénylate cyclase (Barak *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 1995). Cette même mutation effectuée sur le récepteur NK1 et celui de l'angiotensine II réduit la séquestration de 25% (Böhm *et al.* 1997; Hunyady *et al.*, 1995). Toutefois, le rôle joué par ce motif dans l'endocytose du récepteur n'est pas universel puisque la mutation de cette même Tyr chez le récepteur peptidique de la libération de la gastrine (gastrin-releasing peptide) ne nuit pas à l'internalisation (Slice *et al.*, 1994).

3.1.6 Le motif BBXB/BBXXB du récepteur APL5-HT

Il n'y a pas de motif universel de récepteur couplé à la protéine G impliqué dans la liaison et l'activation des protéines G. Un motif particulier peut s'avérer être essentiel à un récepteur dans sa fonction de transduction mais peut demeurer une caractéristique propre à ce seul récepteur (Eason *et al.*, 1995). Toutefois, certains domaines nécessaires à l'activation de la protéine G sont partagés d'une manière approximative par plusieurs récepteurs. La deuxième boucle intracellulaire, la troisième boucle intracellulaire et, plus rarement, la queue carboxy-terminale sont des domaines auxquels on attribue des rôles majeurs dans l'activation de la protéine G. Le récepteur de l'aplysie possède dans les régions carboxy-terminale et amino-terminale de la troisième boucle intracellulaire 6 motifs riches en résidus basiques souvent relatés chez les récepteurs couplés à Gi (Murayama *et al.*, 1990; Okamoto *et al.*, 1990). Le motif qui prend soit la forme B-B-X-B ou soit celle B-B-X-X-B (B: tout résidu basique; X: n'importe quel autre résidu) est parfois précédé, dans la portion amino-terminale du récepteur, de deux résidus basiques. Le cas échéant, le motif et les résidus basiques qui l'accompagnent occupent une portion de 10 à 26 acides aminés le long de la séquence (Okamoto et Nishimoto, 1992). La présence de ces deux résidus basiques n'est pas un critère obligatoire pour rendre le motif opérationnel (Lee *et al.*, 1996). Quoi qu'il soit retrouvé le plus souvent dans la portion carboxy-terminale du récepteur le motif peut occuper d'autres domaines liés à l'activation de la protéine G. Le récepteur muscarinique m2 chez le porc possède un tel motif dans sa deuxième boucle intracellulaire. Chez le récepteur de l'aplysie, comme chez la plupart des récepteurs α_2 -adrénergiques, deux de ces motifs sont présents dans la portion amino-terminale de la troisième boucle intracellulaire (Okamoto et Nishimoto, 1992).

3.2 Les modifications post-traductionnelles

3.2.1 La cystéine 475 du récepteur APL5-HT

Située à 8 résidus du TM VII, la cystéine 475 est l'unique site de la queue cytosolique pouvant être acylé. La formation d'une quatrième boucle intracellulaire suite à l'ancrage dans la membrane de la cystéine palmitoylée diminue l'accès de la queue cytosolique aux kinases régulatrices. La queue cytosolique du récepteur de l'aplysie contient 2 sites putatifs de phosphorylation, l'un pouvant être une cible pour la PKC et l'autre, plus distal, pour la PKA. Quoiqu'il soit clairement démontré que la palmitoylation des récepteurs β 2-adrénergique et dopaminergique D1 joue un rôle majeur dans les fonctions de régulation, ce rôle est moins clairement défini pour plusieurs autres récepteurs de la famille (Kawate et Menon, 1994; Nussenzveig *et al.*, 1993; van Koppen et Nathanson, 1991). Parmi les récepteurs à la sérotonine, le 5-HT1B est palmitoylé mais le rôle fonctionnel de cette acylation reste à être déterminé (Ng *et al.*, 1993)

3.2.2 Le lien disulfure du récepteur APL5-HT

Un lien potentiel disulfure est susceptible de se former chez le récepteur APL5-HT. À l'interface de la première boucle extracellulaire et du TMIII ainsi que dans la deuxième boucle extracellulaire on observe la présence de résidus cystéines pouvant former un pont disulfide. Ces deux cystéines sont très bien conservées chez les récepteurs couplés à la protéine G (fig. 12). Deux cystéines situées dans la troisième boucle extracellulaire pourraient aussi participer à la formation de liens disulfures. Ces cystéines sont cependant moins conservées que celles des autres boucles extracellulaires.

3.2.3 Les sites de glycosylation chez le récepteur APL5-HT

Six sites de glycosylation sont présents sur la queue amino-terminale du récepteur de l'aplysie. Ces sites correspondent aux asparagines retrouvées dans le motif Asn-X-Ser/Thr situés sur la queue extracellulaire du récepteur.

3.2.4 Les sites de phosphorylation

Les régions intracellulaires du récepteur possèdent 12 sites potentiels de phosphorylation. Trois de ces sites, situés dans la troisième boucle intracellulaire, sont susceptibles d'être phosphorylés par la β ARK. Un seul site de phosphorylation par la PKA est retrouvé sur la queue carboxy-terminale. Les autres sites sont des cibles de phosphorylation par la PKC et la CK₂ (kinase de la créatinine).

4. CONCLUSION

La séquence d'un nouveau gène codant pour un récepteur a été déterminée chez le gastéropode *Aplysia californica*. La comparaison de cette séquence avec celles disponibles dans les banques de gènes suggère que ce récepteur est de type sérotoninergique. L'analyse d'hydrophilicité de la protéine confirme la présence des 7 segments transmembranaires présents chez tous les récepteurs couplés à la protéine G. L'observation de la structure primaire du récepteur révèle la présence de résidus et de motifs clés impliqués dans des fonctions de liaison à l'agoniste et à la protéine G propres à cette famille de récepteurs. La régulation de la fonction de transduction est aussi contrôlée par des motifs consensus de la séquence du récepteur. Les études subséquentes chercheront à caractériser pharmacologiquement le récepteur APL5-HT de l'aplysie. Les études fonctionnelles menées chez l'animal sur ce récepteur préalablement localisé par des études faites *in situ* permettront de mieux comprendre la fonction sérotoninergique dans le système nerveux de l'aplysie.

BIBLIOGRAPHIE

Adham N., Kao H.-T., Schechter L. E., Bard J., Olsen M., Urquhart D., Durkin M., Hartig P. R., Weinshank R. L. et Branchek A. Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 408-412, 1993.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., et Lipman D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990.

Amlaiky N., Ramboz S., Boschert U., Plassat J. L. et Hen R. The mouse 5-HT_{1E}-like serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus. *J. Biol. Chem.* 267: 19761-19764, 1992.

Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230, 1973.

Arora K. K., Cheng Z. et Catt K. J. Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropine-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. *Mol. Endo.* 11: 1203-1212, 1997.

Arora K. K., Sakai A. et Catt K. J. Effects of the second intracellular loop mutations on signal transduction and internalization of the gonadotropine-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 16602-16609, 1995.

Barak L. S., Tiberi M., Freedman N. J., Kwatra M. M., Lefkowitz R. J. et Caron M. G. A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta-2-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 269: 2790-2795, 1994.

Bard J. A., Zgombick J., Adham N., Vaysse P., Branchek T. A. et Weinshank R. L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 268: 23422-23426, 1993.

Barnes P. J. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am. Respir. Crit. Care Med.* 152: 838-860, 1995.

Benovic J. L., Kuhn H., Weyland I., Codina J., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8879-8882, 1987.

Benovic J. L., Pike L. J., Cerione R. A., Staniszewski C., Yoshimasa T., Codina J., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Phosphorylation of the mammalian β 2-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 7094-7101, 1985.

Bichet D. G., Arthus M. F., Lonergan M., Hendy G. N., Paradis A. J., Fujiwara T. M., Morgan K., Gregory M. C., Rosenthal W., Didwania A., Antaramian A. et Birnbaumer M. X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis. *J. Clin. Invest.* 92: 1262-1268, 1993.

Blake A. D., Mumford R. A., Strout H. V., Slater E. E. et Strader C. D. Synthetic segments of the mammalian beta adrenergic receptor are preferentially recognized by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 168-173, 1987.

Böhm S. K., Grady E. F. et Bunnet N. W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322: 1-18, 1997.

Bouvier M., Nantel F., Valiquette M., Moffett S. et Mouillac B. Le récepteur β_2 -adrénergique: Un modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la désensibilisation. *médecine/sciences* 11: 819-827, 1995.

Bouvier M., Haussdroff W. P., De Blasi A., O'Dowd B. F., Kobilka B. K., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Removal of phosphorylation sites from β_2 -adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333: 370-373, 1988.

Brown G. C. Electrostatic coupling between membrane proteins. *FEBS Lett.* 260: 1-5, 1990.

Carpenter D. O., Bresse G., Schanberg S. et Kopin I. Serotonin and dopamine: distribution and accumulation in *Aplysia* nervous and non-nervous tissues. *Int. J. Neurosci.* 2: 49-56, 1971.

Chanda P. K., Minchin M. C. W., Davis A. R., Greenberg L., Reilly Y., McGregor W. H., Bhat R., Lubeck M. D., Mizutani S. et Hung P. P. Identification of residues important

for ligand binding to the human 5-hydroxytryptamine 1A serotonin receptor. *Mol. Pharmacol.* 43: 516-20 1993.

Cheung A. H., Huang R. R. C. et Strader C. D. Involvement of specific hydrophobic, but not hydrophilic, amino acids in the third intracellular loop of the beta-adrenergic receptor in the activation of Gs. *Mol. Pharmacol.* 41: 1061-1065, 1992.

Cheung A. H., Huang R. R. C., Graziano M. P. et Strader C. D. Specific activation of Gs by synthetic peptides corresponding to an intracellular loop of the beta-adrenergic receptor. *FEBS Lett.* 279: 277-280, 1991.

Chilmonczyk Z. Models of 5-Hydroxytryptamine receptors. A review. *J. Pharm.* 47: 791-801, 1995.

Choudhary M. S., Craig S. et Roth B. L. A single point mutation (Phe340 to Leu340) of a conserved phenylalanine abolishes 4-(¹²⁵I)iodo-(2,5-dimethoxy) phenylisopropylamine and (³H)mesulergine but not (³H)ketanserin binding to 5-hydroxytryptamine₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* 43: 755-761, 1993.

Claeysen S., Sebben M., Journot L., Bockaert J. et Dumuis A. Cloning, expression and pharmacology of the mouse 5-HT_{4L} receptor. *FEBS Lett.* 398: 19-25, 1996.

Clapham D. E. et Neer E. J. G protein βγ subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 167-203, 1997.

Clark R. B., Friedman J., Dixon R. A. F. et Strader C. D. Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the β -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* 36: 343-348, 1989.

Cook J. et Eidne K. A. An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology.* 138: 2800-2806, 1997.

Colas J. F., Launay J. M., Kellermann O., Rosay P. et Maroteaux L. Drosophila 5-HT₂ serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5441-5445, 1995.

Cotecchia S., Ostrowski J., Kjelsberg A., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Discrete amino acid sequence of the alpha-1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 267: 1633-1639, 1992.

Cotecchia S., Kobilka B. K., Daniel K. W., Nolan R. D., Lapetina E. Y., Caron M. G., Lefkowitz R. J. et Regan J. W. Multiple second messenger pathways of a alpha-adrenergic receptor subtype expressed in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 265: 63-69, 1990.

Dixon R. A. F., Kobilka B. K., Strader D. J., Benovic J. L., Kohlman H. G., Frielle T., Bolanowski M. A., Bennett C. D., Rands E., Diehle R. E., Mumford R. A., Slater E. E., Sigal I. S., Caron M. G., Lefkowitz R. J. et Strader C. D. Cloning of the gene and cDNA

for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-79, 1986.

Drummond A. H., Bucher F. et Levitan I. B. Distribution of serotonin and dopamine receptors in *Aplysia* tissues: analysis by [3 H]LSD binding and adenylate cyclase stimulation. *Brain. Res.* 184: 163-177, 1980.

Eales N. B. Revision of the world species of *Aplysia* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Bulletin of the British Museum (natural history), Zoology.* London. 5: 1-407, 1960.

Eason M. G. Liggett S. B. Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha-2A-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 24753-24760, 1995.

Erlander M. G., Lovenberg T. W., Baron B. M., Delecea L., Danielson P. E., Racke M., Slone A. L., Siegel B. W., Foye P. E., Cannon K., Burns J. E. et Sutcliffe J. G. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 3452-3456, 1993.

Eskin A., Corrent G. Lin C.-Y. et McAdoo D. J. Mechanism for shifting the phase of a circadian rhythm by serotonin: involvement of cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 660-664, 1982.

Ferguson S. S. G., Ménard L., Barrak L. S., Koch W. J., Colapietro A. M. et Caron M. G. Role of phosphorylation in agonist-promoted β_2 -adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* 270: 24782-24790, 1995.

Fraser C. M., Wang C.-D., Robinson D. A., Gocayne J. D. et Venter J. C. Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol. Pharmacol* 36: 840-7, 1989.

Forguet M., Hoyer D., Pardo L. A., Parekh A., Kluxen F. W., Kalkman H. O., Stuhmer W. et Lubbert H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J.* 11: 3481-3487, 1992.

Gaddum J. H. et Picarelli Z. P. Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 12: 323-328, 1957.

Gantz I., DelValle J. Wang L. D., Tashiro T., Munzert G., Guo y. J., Konda Y. et Yamada T. Molecular basis for the interaction of the histamine with the histamine H2 receptor. *J. Biol. Chem* 267: 20840-20843, 1992.

Gerhardt C.C., Leysen J. E., Planta R. J., Vreugdenhil E. et Van Heerikhuizen H. Functional characterisation of a 5-HT2 receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur. J. Pharmacol.* 311: 249-258, 1996.

Gerschenfeld H. M. et Paupardin-Tritsch D. Ionic mechanisms and receptor properties underlying the responses of molluscan neurones. *J. Physiol.* 243: 427-456, 1974.

Ghiselin T. M. The origin of molluscs in the light of molecular evidence. Oxford survey in evolutionary biology. Vol. 5. édité par P. H. Harvey et L. Partridge, 1988.

Goldman P. S. et Nathanson N. M. Differential role of the carboxy-terminal tyrosine in down-regulation and sequestration of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 269: 15640-15645, 1994.

Gudermann T., Kalkbrenner F. et Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 429-459, 1996.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580, 1983.

Hausdorff W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Phosphorylation sites on two domains of the β 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. J. Biol. Chem. 264: 12657-12665, 1989.

Herrick-Davis K., Egan C. et Teitler M. Activating mutations of the serotonin 5-HT_{2C} receptor. J. Neurochem. 69: 1138-1144, 1997.

Heuring R. E. et Peroutka S. J. Characterization of a novel ³H-5-HT binding site subtype in bovine brain membranes. J. Neurosci. 7: 894-903, 1987.

Hibert M. F., Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A. et Hoflack J. Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 40: 8-15, 1991.

Ho B. Y., Karschin A., Branchek T., Davidson N., Lester A. The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and in function of the 5-HT_{1A} receptor: a site-directed mutation study. *FEBS Lett.* 312: 259-262, 1992.

Hunyady L., Bor M., Baukal A. J., Balla T. et Catt K. J. A conserved NPLFY sequence contributes to agonist binding and signal transduction but is not an internalization signal for the type 1 angiotensin II receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 16602-16609, 1995.

Israel D. I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. *Nucleic Acids Res.* 21: 2627-2631, 1993.

Johnson M. P., Loncharich R. J., Baez M. et Nelson L. D. Species variations in transmembrane region V of the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor alter the structure-activity relationship of certain ergolines and tryptamines. *Mol. Pharmacol.* 45: 277-286, 1993.

Julius D., MacDermott A. B., Axel R. and Jessel T. M. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1C receptor. *Science* 241: 558-564, 1988.

Kaczmarek L. K., Jennings K. et Strumwasser. Neurotransmitter modulation, phosphodiesterase inhibitory effects, and cyclic AMP correlates of afterdischarge in peptidergic neurites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5200-5204, 1978.

Kadan M. J. et Hartig P. R. Autoradiographic localization and characterization of [¹²⁵I]lysergic acid diethylamide binding to serotonin receptors in *Aplysia*. *Neuroscience* 24: 1089-1103, 1988.

Kawaguchi T., Hamanaka T. et Kito Y. X-ray diffraction pattern from internal structure of bovine rhodopsin. *J. Biochem.* 119: 396-399, 1996.

Kawahara H., Isoai A. et Shizuri Y. Molecular cloning of a putative serotonin receptor gene from barnacle, *Balanus amphitrite*. *Gene* 184: 245-250, 1997.

Kawate N. et Menon K. M. J. Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriongonadotropin receptors in transfected cells. *J. Biol. Chem.* 269: 30651-30658, 1994.

Kjelsberg M. A., Cotecchia S., Ostrowski J., Caron M. et Lefkowitz R. J. Constitutive activation of the adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. *J. Biol. Chem.* 267: 1430-1433, 1992.

Kao H. T., Adham N., Olsen M. A., Weinshank P. R. et Hartig P. R. Site directed mutagenesis of a single residue changes the binding properties of the serotonin 5-HT₂ receptor from a human to a rat pharmacology. *FEBS Lett.* 307: 324-328, 1992.

Kyte J. et Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol* 157: 105-132, 1982.

Lee N. H., Geoghagen N. S. M., Cheng E., Cline R. T. et Fraser C. M. Alanine scanning mutagenesis of conserved arginine/lysine-arginine/lysine-X-X-arginine/lysine G protein-activating motifs on m1 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 50: 140-148, 1996.

Lefkowitz R. J., Cotecchia S., Samana P., Costa T. Constitutive activity of receptors couples to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 303-307, 1993.

Lemche H. A new living deep-sea mollusc of the cambro-devonian class monoplacophora. *Nature* 179: 413-416, 1957.

Leonhardt S., Herrick-Davis K. et Titeler M. Detection of a novel serotonin receptor subtype (5-HT1E) in the human brain: interaction with a GTP-binding protein. *J. Neurochem.* 53: 465-471, 1989.

Li X.-C., Giot J.-F., Kuhl D., Hen R. et Kandel R. Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. *J. Neurosci.* 15: 7585-7591, 1995.

Liebeswar G., Goldman J. E., Koester J. et Mayeri E. Neural control of circulation in *Aplysia*. III. Neurotransmitters. *J. Neurophysiol.* 38: 767-779, 1975.

Liggett S. B., Caron M. B., Lefkowitz R. J., Hnatowich M. Coupling of a mutated form of the human beta-2-adrenergic receptor to Gi and Gs. *J. Biol. Chem.* 266: 4816-4821, 1991.

Liu J., Conklin B. R., Blin N., Yun J. et Wess J. Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 11642 1995.

Logothetis D. E., Kurachi Y., Galper J., Neer E. J. Clapham D. E. The β - γ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325: 321-326, 1987.

Lohse M. J., Benovic J. L., Caron M. G. et Lefkowitz R. J. Multiple pathways of rapid β 2-adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J. Biol Chem.* 265: 3202-3209, 1990.

Malek D., Münch G., et Palm D. Two sites in the inner loop of the dopamine D2 receptor are involved in functional G protein-mediated coupling to adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 325: 215-219, 1993.

Mangum C. P. The fourth annual riser lecture: the role of physiology and biochemistry in understanding animal phylogeny. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 103: 235-247, 1990.

Maniatis T., Sambrook J. et Fritsch E. F. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2ième édition, 1989.

Mansour A., Meng F., Meador-Woodruff J. H., Taylor L. P., Civelli O. et Akil H. Site-directed mutagenesis of the human dopamin D2 receptor. Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharm. Sect. 227: 205-14. 1992.

Maricq A. V., Peterson A. S., Brake A. J., Myers R. M. Julius D. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. Science 254: 432-7, 1991.

Marois R. et Carew T. J. Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. J. Comp. Neur. 386: 477-490, 1997.

Maroteaux L., Saudou F., Amlaiky N., Boschert U., Plassat J. et Hen R. The mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression and localisation in motor control centers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 3020-3024, 1992.

Matthes H., Boschert U., Amlaiky N., Grailhe R., Plassat J. L., Muscatelli F., Mattei M. G. et Hen R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors-cloning, functional expression, and chromosomal localization. Mol. Pharmacol. 43: 313-319, 1993.

Middlemiss D. N. et Frozard J. R. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁-recognition site. *Eur. J. Pharmacol.* 90: 151-153, 1983.

Monsma F. J., Shen Y., Ward R. P., Hamblin M. W. et Sibley D. R. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol. Pharmacol.* 43: 320-327, 1993.

Murayama Y., Okamoto T., Ogata E., Asano T., Iiri T., Katada T., Ui M., Grubb J. H., Sly W. S. et Nishimoto I. Distinctive regulation of the functional linkage between the human cation-independent mannose 6-phosphate receptor and GTP-binding proteins by insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 265: 17456-17462, 1990.

Ng G. Y. K., George S. R., Zastawny R. L., Caron M., Bouvier M., Dennis M. et O'Dowd F. Human serotonin 1B receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. *Biochem.* 32: 11727-11733, 1993.

Noda K., Saad Y., Grahem R. M. et Karnik S. S. The high affinity state of the β ₂-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *J. Biol. Chem.* 269: 6743-6752, 1994.

Nussenzweig D. R., Heinfink M. et Gershengorn M. C. Agonist-stimulated internalisation of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the carboxy-terminus. *J. Biol. Chem.* 268: 2389-2392, 1993.

O'Dowd B. F., Hnatowich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J. et Bouvier M. Palmitoylation of the human β 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 7564-7569, 1989.

O'Dowd B. F., Hnatowich M., Regan J. W., Leader M, Caron M. G. Site directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta-2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 15985-15992, 1988.

Okamoto Y., Ninomiya H., Tanioka M., Sakamoto A., Miwa S. et Masaki T. Palmitoylation of human endothelinB . *J. Biol. Chem.* 272: 21589-21596, 1997.

Okamoto T. et Nishimoto I. Detection of G protein-activator regions in M4 muscarinic, cholinergic, and α 2-adrenergic receptors based upon characteristics in primary structure. *J. Biol. Chem.* 267: 8342-8346, 1992.

Okamoto T., Katada T., Muramaya Y., Inagaki M., Ogata E. et Nishimoto I. A simple structure encodes G-protein-activating function of the IGF-11/mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 62: 709-717, 1990.

Olde B. et McCombie R. Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 8: 53-62, 1997.

Onorato J. J., Palczewski K., Regan J. W., Caron M. G., Lefkowitz R. J. et Benovic J. L. Role of acidic amino acids in peptide substrates of the β -adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochem.* 30: 5118-5125, 1991.

Ostrowski J., Kjelsberg M. A., Caron M. G., et Lefkowitz R. J. Mutagenesis of the beta-2-adrenergic receptor: how structure elucidates function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 167-183, 1992.

Ovchinnikov Y. A., Abdulaev N. G. et Bogachuk A. S. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett.* 230: 1-5, 1988.

Ovchinnikov Y. A. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett.* 148: 179-191, 1982.

Palczewski K., Arendt A., McDowell J. H. et Hargrave P. A. Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions and polycations. *Biochem.* 28: 8764-8770, 1989.

Parton R. G. et Simons K. Digging into caveolae. *Science* 269: 1398-1399, 1995.

Pazos A., Hoyer D. et Palacios J. M. The binding of serotonergic ligand to the porcine choroid plexus: characterisation of a new type of serotonin recognition site. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 539-546, 1984.

Pedigo N. W., Yamamura H. I. et Nelson D. L. Discrimination of multiple ³H-5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J. Neurochem.* 36: 220-226, 1981.

Peroutka S. J. 5-HT receptors: past, present, and future. *Trends Neurosci.* 18: 68-69, 1995.

Peroutka S. J. 5-hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many?. *Neurochem. Int.* 25: 533-536, 1994.

Peroutka S. J. et Snyder S. H. Multiple serotonin receptors: Differential binding of ^3H -5-hydroxytryptamine, ^3H -lysergic acid diethylamide and ^3H -spiroperidol. *Mol. Pharmacol.* 16: 687-689, 1979.

Pitcher J. A., Lohse M. J., Codina J., Caron M. G., et Lefkowitz R. J. Desensitization of the isolated β -2-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependant protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochem.* 31: 3193-3197, 1992.

Plassat J. L., Boschert U., Amlaiky N. et Hen R. The mouse 5-HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5-HT_{1D} receptor family. *EMBO. J.* 11: 4779-4786, 1992.

Prichett D. B., Bach A. W., Wozny M., Taleb O., Daltoso R., Shih J. C. et Seeburg P. H. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5-HT₂ receptor. *EMBO. J.* 7: 4135-4140, 1988.

- Probst W. C., Snyder L. A., Schuster D. I., Brosius J., et Sealfon S. C. Sequence alignment of the G protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell. Biol.* 11: 1-20, 1992.
- Prossnitz E. R., Schreiber R. E., Bokoch G. M. et Ye R. D. Binding of low affinity N-formyl peptide receptors to G protein. Characterization of a novel inactive receptor intermediate. *J. Biol. Chem.* 270: 10686-10694, 1995.
- Rosenthal W., Antaramian A., Gilbert S. et Birnbaumer M. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 268: 13030-13033, 1993.
- Rosenzweig Z. et Kindler S. H. Epinephrine and serotonin activation of adenylyl cyclase from *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Lett.* 25: 221-223, 1972.
- Roth B. L., Choudhary M. S., Khan N. et Uluer A. Z. High-affinity agonist binding is not sufficient for agonist efficacy at 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors: evidence in favor of a modified ternary complex model. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 280: 576-583, 1997.
- Saltzman A. G., Morse B., Whitman M. M., Ivanshchenko Y., Jaye M. et Felder S. Cloning of the human serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1C} receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1469-1478, 1991.
- Saudou F., Boschert U., Amlaiky N., Plassat J. L. et Hen R. A family of drosophila serotonin receptors with distinct intracellular signalling properties and expression patterns. *EMBO J.* 11: 7-17, 1992.

Saxena P. R. Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacol. Therap.* 66: 339-368, 1995.

Saxena P. R., van Houwelingen P. et Bonta I. L. The effect of mianserin hydrochloride on the vascular responses to 5-hydroxytryptamine and related substances. *Eur. J. Pharmacol.* 13: 295-305, 1971.

Sibley D. R., Strasser R. H., Benovic J. L. Daniel K. et Lefkowitz R. J. Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9408-9412, 1986.

Slice L. W., Wong H. C., Sternini C., Grady E. F., Burnett N. W. et Walsh J. H. The conserved NPXnY motif present in the gastrin-releasing peptide receptor is not general sequestration sequence. *J. Biol. Chem.* 269: 21755-21761, 1994.

Sprague G. F. Signal transduction in yeast mating: receptors, transcription factors, and the kinase connection. *Trends Genet.* 7: 393-398, 1991.

Strader C. D., Sigal I. S., Register B., Candelore M. R., Rands E., Dixon R. A. F. Identification of residues required for ligand to the β -adrenergic receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 4384-4388, 1987.

Sugamori K. S., Sunahara R. K., Guan H. C., Bulloch A. G. M., Tensen C. P., Seeman P., Niznik H. B., et Vantol H. H. M. Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnea stagnalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11-15, 1993.

Sumner M. J. et Humphrey P. P. A. 5-HT_{1D} binding sites in the porcine brain can be subdivided by GR43175. Brain. J. Pharmacol. 98: 29-31, 1989.

Sylte I., Edvardsen O., Dahl S. G., Molecular modelling of UH-301 and 5-HT_{1A} receptor interactions. Protein Eng. 9: 149-160, 1996.

Thomas W. G., Baker K. M. Motel T. J. et Thekkumkara T. J. Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. J. Biol. Chem. 270: 22153-22159, 1995.

Trowbridge I. S., Collawn J. F. et Hopkins C. R. Signal-dependant membrane protein trafficking in the endocytic pathway. Annu. Rev. Cell Biol. 9: 129-161, 1993.

Valiquette M., Bonin H., Hnatowich M., Caron. M. G., et Lefkowitz R. Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β -adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 5089-5093, 1990.

Van Koppen C. J. et Nathanson N. M. The cysteine residue in the carboxy-terminal domain of the m2 muscarinic acetylcholine receptor is not required for receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase J. Neurochem. 57: 1873-1877, 1991.

Van Rhee A. M et Jacobson A. Molecular architecture of protein-coupled receptors. *Drug Dev. Res.* 37: 1-38, 1996.

Von Nickisch-Rosenegk E., Krieger J., Kubick S., Laage R., Strobel J., Strotmann J. et Breir H. Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombix mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 817-827, 1996.

Wang C.-D., Gallaher T. K. et Shih J. C. Site-directed mutagenesis of the serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor: identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation. *Mol. Pharmacol.* 43: 931-940, 1993.

Wang C.-D. Site-directed mutagenesis of alpha-2-A-adrenergic receptors: identification of amino acids involved in the ligand binding and receptor activation by agonists. *Mol. Pharmacol.* 40: 168-179 1991.

Weiger W. A. Serotonergic modulation of behavior: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.* 72: 61-95, 1997.

Weiss K. R., Mandelbaum D. E., Schonberg M et Kupfermann I. Modulation of buccal muscle contractibility by serotonergic metacerebral cells in *Aplysia*: evidence for a role of cyclic adenosine monophosphate. *J. Neurophysiol.* 42: 791-803, 1979.

Wess J., Bonner T. I., Dörje R. et Brann M. R. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of the coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol. Pharmacol.* 38: 517-523, 1992.

Witz P., Amalaiky N., Plassat J. L., Maroteaux L., Borrelli E. et Hen R. Cloning and characterization of a drosophila serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8940-8944, 1990.

Wong S. K.-F., Parker E. et Ross E. M. Chimeric muscarinic cholinergic: beta adrenergic receptor that activates G_s in response to muscarinic agonists. *J. Biol. Chem.* 6219-6224, 1990.

Yakel J. L., Shao X. M., Jackson M. B. The selectivity of the channel coupled to the 5-HT₃ receptor. *Brain Res.* 533: 46-52, 1990.

Yu S. S., Lefkowitz R. J., Hausdorff W. P. β -adrenergic receptor sequestration: a potential mechanism for receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 268: 337-341, 1993.

Zhu S. Z., Wang S. Z., Hu J. et El-Fakahany E. E. An arginine residue conserved in most G protein-coupled receptors is essential for the function of the M1 muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* 45: 517-523, 1994.

Zuckerandl E. et Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8: 357-366, 1965.

Zvyaga T. A., Min K. C., Beck M. et Sakmar T. P. Movement of the retinylidene Schiff base counterion in rhodopsin by one helix turn reverses the PH dependence of the metarhodopsin 1 to metarhodopsin 2 transition. *J. Biol. Chem.* 268: 4661-4667, 1993.

Remerciements

Je remercie mon directeur Michel Anctil et mon codirecteur Michel Bouvier grâce à qui je peux mener un travail de recherche qui me tient à coeur ainsi que Luc Desgroseillers et les membres de son laboratoire qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances techniques. Je désire également remercier Denise Rompré, Joanne Noiseux, Diane Lacasse et les autres membres du secrétariat ainsi que Louise Pelletier, Hélène Lavigne, Nelly Banon et Jacques Nadeau qui, par leur disponibilité et leurs compétences, apportent une aide précieuse à celles et ceux qui font de la recherche au département. Que Ginette Fafard, Adèle Brodeur, Marc Waller, Claude Gauthier et les autres membres de la bibliothèque veuillent bien aussi être assurés de ma reconnaissance.