HAL
open science

Analyse comparée des récepteurs D1 de la dopamine chez les vertébrés : Définition des caractères fonctionnels spécifiques de chacun des sous-types du récepteur D1

Stéphane Le Crom

To cite this version:

Stéphane Le Crom. Analyse comparée des récepteurs D1 de la dopamine chez les vertébrés : Définition des caractères fonctionnels spécifiques de chacun des sous-types du récepteur D1. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2000. Français. NNT : . tel-00009188

HAL Id: tel-00009188

https://theses.hal.science/tel-00009188

Submitted on 5 May 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY

N° D'ORDRE

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI ORSAY

PAR

Stéphane LE CROM

SUJET :

Analyse comparée des récepteurs D_1 de la dopamine chez les vertébrés :

- Définition des caractères fonctionnels spécifiques de chacun des sous-types du récepteur D_1

Soutenue le 22 septembre 2000 devant la Commission d'examen :

M. André ADOUTTE	Président
M. Thierry GALLI	Rapporteur
M. Vincent HOMBURGER	Rapporteur
M. Jean-Philippe PIN	Examinateur
M. Philippe VERNIER	Examinateur

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements aux Docteurs Vincent HOMBURGER et Thierry GALLI pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse malgré leurs charges respectives et pour avoir sacrifié leur mois d'août à sa lecture. Je prie Monsieur le Professeur André ADOUTTE, qui me fait l'honneur de présider ce jury, de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude. Je le remercie pour m'avoir introduit lors du DEA de "Biologie Moléculaire de la Cellule" à la complexité de l'arbre du vivant. Je suis également très reconnaissant au Docteur Jean-Philippe PIN d'avoir accepté d'examiner ce travail en dépit d'un emploi du temps très chargé.

Je remercie le Docteur Philippe VERNIER de m'avoir permis de travailler sur la biologie cellulaire des récepteurs de la dopamine et pour le sacrifice de ces heures de sommeil à la correction des nombreux travaux que je lui ai présentés. Je le remercie surtout de bien vouloir examiner cette thèse malgré l'agrandissement récent de sa famille. J'adresse toute ma reconnaissance au Professeur Jean-Didier VINCENT qui dès le départ a accepté de m'accueillir au sein de l'Institut Alfred Fessard.

Je suis infiniment reconnaissant à Bruno CARDINAUD, Cécile MORICE et Dominique GUIVARC'H de m'avoir accompagné, conseillé et soutenu dans mes débuts au laboratoire. Je remercie également Emmanuel MOYSE pour m'avoir initié aux neurosciences et pour son aide précieuse à la préparation de mon avenir.

Je voudrais exprimer tous mes remerciements à Sandra KÖNIG, Delphine PROU, Michèle VÉRON et Fatiha NOTHIAS pour leur aide inestimable et leurs remarques au cours de la rédaction de ma thèse. Grâce à leurs conseils et leur disponibilité, j'ai réussi à passer cette période de rédaction dans de bonnes conditions.

Je souhaite beaucoup de motivation à Michel, Jean-Paul, Raphaël, David, Isabelle et Stéphane pour poursuivre leur programme sportif commencé dans la vallée de Chevreuse et pour m'avoir fait découvrir les environs de Gif.

Je voudrais remercier ici Marta, Hélène, Sophie, Frédéric, Aminatta, David, Sylvia, Albert, Uz, Catherine, Marika, Véronique, Bernard, Thomas, Jean-Vianney, Florian, Allan, Christelle, Anne, Kim et Béatrice, qui, au cours de ces années, ont contribué à rendre l'ambiance de travail agréable et qui ont participé à l'approfondissement de mes connaissances en informatique.

J'aimerais également adresser toute ma gratitude au personnel de l'Institut Alfred Fessard et tout particulièrement à Michel BOUDINOT, Willy BEUJEAN, Jean-Paul

BOUILLOT, Odette CHAMPION, Alain PERRIGNON, Odile LECQUYER, Geneviève CLÉNET et Hélène HRYN pour leur aide tout au long de cette thèse.

Je voudrais rendre ici hommage à Hyman NIZNIK qui m'a accueilli dans son laboratoire lors de mon premier séjour outre-atlantique et qui est décédé cette année. J'adresse tous mes remerciements à Kim SUGAMORI, Zdenek PRISTUPA et Frank LEE pour leur encadrement technique lors de cette collaboration et pour la découverte de Toronto.

Je remercie Jacqueline VERDIÈRE, Martine HEUDE et Fabienne CHALVET pour leurs précieux conseils et leur encadrement efficace tout au long des enseignements de génétique. Ces heures de travaux dirigés m'ont offert d'excellents souvenirs et un vrai changement dans la vie du laboratoire.

Je voudrais souhaiter bonne chance à tous ceux qui ont contribué à rendre l'année de DEA exceptionnelle Julie, Sandrine, Marine, Anne, Anne-Marie, Sabine, Vincent, Karin, Andréia et Frédéric. Je voudrais adresser ma plus grande reconnaissance au Professeur Michel JACQUET pour m'avoir accepter dans son DEA et à Murielle DECRAENE pour sa disponibilité et son efficacité lors des démarches administratives.

Je tiens ici à remercier ma famille et mes proches pour m'avoir aidé et soutenu tout au long de ces trois années malgré toutes les épreuves traversées. Je souhaite bon courage à tous mes amis, Frédéric, Claire, Nathanaëlle, Frédéric, Morvan, Christophe, Anne-Marie, Jean-Michel, Cécile, Laurent, Anne-Claire, Jade, Cyril, Anne, Guillaume, Catherine, Hélène, Vincent, Latifa et Marion qui m'ont soutenu, encouragé et aidé à comparer tous les aspects de la vie professionnelle (et surtout de l'enseignement!).

Enfin, je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Isabelle qui a certainement été mon plus précieux soutien. Sans elle je n'aurais sûrement pas pu terminer ce travail dans de bonnes conditions. Elle a réussi à accepter une vie de laboratoire envahissante et à supporter mon caractère. Je la remercie de tout mon cœur et j'espère pouvoir lui apporter autant d'attention quand elle en aura besoin.

"We choose to go to The Moon in this decade,
and do the other things not because they are easy,
but because they are hard"

John Fitzgerald KENNEDY
12 septembre 1962, Houston, Texas

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS 9
TABLEAU DES COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES 10
TABLEAU DES TYPES CELLULAIRES 11
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 12

INTRODUCTION 15
I. Avant-propos 17
II. Classification et histoire évolutive des récepteurs de la dopamine 20
II.A. La classification des récepteurs de la dopamine 20
II.B. Histoire évolutive des récepteurs de la dopamine 24
II.B.1. Les méthodes d'analyse évolutive 26
II.B.2. L'évolution des cordés 28
II.B.3. Histoire évolutive des récepteurs D_1 chez les vertébrés 31
III. Localisation des récepteurs D_1 de la dopamine 35
III.A. Les récepteurs D_1 de la dopamine dans le système nerveux central 35
III.A.1. Localisation régionale 36
III.A.2. Localisation subcellulaire 40
III.B. Biosynthèse et adressage intracellulaire des récepteurs D_1 42
III.B.1. Les voies de biosynthèse des récepteurs de la dopamine 42
III.B.2. La localisation spécifique des récepteurs dans les cellules polarisées 46
III.B.3. L'adressage fonctionnel différentiel des protéines 48
III.B.4. Dimérisation et adressage fonctionnel des récepteurs D_1 51
IV. Transduction et modulation du signal intracellulaire par les récepteurs D_1 55
IV.A. Couplage des récepteurs aux protéines G et contraintes structurales 56
IV.B. Transduction et formation de complexes supra-moléculaires (“transducisome”) 60
IV.C. Modulation des voies de signalisation intracellulaire par les récepteurs D_1 67
IV.C.1. Les voies de signalisation “historiques” 68
IV.C.2. La dopamine et les canaux ioniques 69
IV.C.3. La dopamine comme facteur de croissance. 70
IV.C.4. La dopamine et les voies des MAPK 72
IV.D. Le cas du récepteur D_{1B} : un récepteur constitutivement actif 74
V. Régulation cellulaire des récepteurs D_1 76
V.A. La désensibilisation des récepteurs D_1 76
V.A.1. Les observations préliminaires 79
V.A.2. La première étape : le découpage fonctionnel 79
V.A.3. L'internalisation des récepteurs 86
V.A.4. Interaction de la désensibilisation et des voies des MAPK 92
V.B. La régulation de l’expression des récepteurs 93
VI. Conclusion 95

MATÉRIEL ET MÉTHODES 97
I. Construction des outils moléculaires 99
I.A. Utilisation de la "Green Fluorescent Protein" (GFP) pour l’analyse du trafic intracellulaire des récepteurs 99
I.B. Méthodes de construction des fusions D_1-GFP 102
II. Méthodes d’analyses biochimiques et pharmacologiques 105
II.A. L'analyse pharmacologique des récepteurs 105
II.A.1. Dosage par liaison à l'équilibre des récepteurs 105

II.A.2. Dosage par déplacement de la liaison à l'équilibre (“compétition”) 106
II.B. Les outils de l'analyse biochimique.....106
II.B.1. Western blot 106
II.B.2. Production de la protéine GST-elk 107
II.B.3. Immunoprécipitation de la protéine GFP.....108
II.C. Analyse fonctionnelle 108
II.C.1. Dosage de l'activité de l’adénylate cyclase 108
II.C.2. Dosage de l'accumulation d'AMPc 110
II.C.3. Dosage de l’activité MAPK 112
III. Systèmes d'expression et méthodes de désensibilisation des récepteurs 113
III.A. Protocoles généraux de culture cellulaire 113
III.B. Transfections et lignées stables 114
III.B.1. Transfection à l'aide d'agents chimiques 114
III.B.2. Transfection par électroporation 115
III.B.3. Obtention de lignées stables 115
III.C. Les méthodes d'étude *in vivo* 116
III.C.1. Micro-injection des œufs de Medaka 116
III.C.2. Culture primaire de neurones de striatum.....117
III.D. Traitements cellulaires et analyse de la désensibilisation 117
IV. Immunocytochimie et observations cellulaires.....118
IV.A. Immunocytochimie 118
IV.B. Observation en microscopie 119
IV.C. Obtention d'anticorps anti-D_1 119

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS 121
I. Observations comparées des profils biochimiques de la désensibilisation 124
I.A. Mise au point des techniques d'étude 124
I.B. Analyses des profils de désensibilisations des récepteurs D_1 dans les cellules transfectées.....130
I.C. Rôle de l'adénylate cyclase dans les phénomènes de désensibilisation des récepteurs D_1 132
I.D. Les interactions entre la stimulation de l'adénylate cyclase et celle des récepteurs D_1 133
I.E. La désensibilisation des récepteurs dans d'autres types cellulaires 134
I.F. Détermination des séquences spécifiques de la désensibilisation des récepteurs D_1....136
I.F.1. Utilisation de chimères des sous-types de récepteurs D_1 136
I.F.2. Rôle de la PKA sur le profil de désensibilisation des récepteurs D_1.....138
II. Étude de l’intervention de l’état cellulaire sur la fonction des récepteurs 139
II.A. Observations des interactions avec les récepteurs de l'adénosine 139
II.B. Analyse des modulations des récepteurs D_{1A} par les récepteurs A_1 de l'adénosine 142
II.B.1. Rappels sur les modes d'interactions entre l'adénosine et la dopamine.....142
II.B.2. Expériences sur la lignée stable (Ltk-) exprimant les récepteurs A_1 et D_{1A}.....145
III. Obtention d'anticorps polyclonaux anti-récepteurs D_1 147
III.A. Caractérisation des anticorps.....147
III.B. Étude morphologique de la désensibilisation des récepteurs D_{1B} 147
IV. Caractérisation des constructions D_1-GFP.....149
IV.A. Vérification des profils pharmacologiques 152
IV.B. Analyse des profils fonctionnels des fusions D_1-GFP 154
IV.C. Observations cellulaires de la localisation des constructions.....157
V. Analyse de la localisation cellulaire des récepteurs D_1 159
V.A. Distribution cellulaire des fusions récepteurs D_1-GFP après exposition à un agoniste dopaminergique.....159

V.A.1. Visualisation de la localisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 159
V.A.2. Observation de la localisation des constructions D_1-GFP dans la lignée 13.S.1.24 162
V.A.3. Analyse des effets de différents composés sur les récepteurs D_1 162
V.B. Lignées stables exprimant les constructions D_1-GFP 164
V.B.1. Obtention des lignées stables dans les cellules HEK 293 164
V.B.2. Observation de la localisation des récepteurs D_1-GFP dans les lignées stables.. 166
V.B.3. Visualisation des récepteurs D_1-GFP par western blot 167
V.C. Les méthodes d'étude *in vivo* 170
VI. Étude des modifications des voies de signalisation des MAP Kinases 172
VI.A. Profils de phosphorylation des voies des MAPK par les récepteurs D_1 174
VI.B. Évolution de l'activité des MAPK au cours de la désensibilisation des récepteurs D_1 176

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 181
I. Les interactions entre les voies de l'adénosine et de la dopamine 183
II. Analyse comparée des profils biochimiques de la désensibilisation des sous-types du récepteur D_1 chez les vertébrés..... 185
II.A. Diversité des systèmes et des méthodes d'étude 185
II.B. Le récepteur D_{1A}, le représentant ancestral des récepteurs de la dopamine 186
II.C. Le récepteur D_{1B}, un récepteur à activité constitutive intrinsèque..... 188
II.D. Le récepteur D_{1C}, un récepteur insensible ou inutile 189
III. Analyse morphologique de la localisation cellulaire des sous-types du récepteur D_1..... 192
III.A. La complexité des méthodes d'analyses employées..... 192
III.B. Mise au point d'anticorps à large spectre de reconnaissance 193
III.C. Les protéines de fusion entre les sous-types du récepteur D_1 et la GFP..... 194
IV. La nécessité des analyses *in vivo*..... 196
V. Analyse des relations des récepteurs de la dopamine et des voies d'activation MAPK 198
V.A. Activation des voies des MAPK par les récepteurs D_1 199
V.B. Les récepteurs D_1 et la protéine B-Raf 200
Conclusion 201

BIBLIOGRAPHIE 203

ANNEXES..... 223

Gines S., Hillion J., Torvinen M., **Le Crom S.**, Casado V., Canela EI., Rondin S., Lew JY., Watson S., Zoli M., Agnati LF., Vernier P., Lluis C., Ferre S., Fuxe K., Franco R (2000). Dopamine D_1 and adenosine A_1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (15): 8606-8611.

Le Crom S., K.S. Sugamori, H.B. Niznik, P. Vernier (2000). Compared dopamine D_1 receptors subtypes desensitization in vertebrates. *Journal of Biological Chemistry* (soumis).

ABRÉVIATIONS

5-HT	Récepteur Sérotonine
AMPA	α-Amino-3-hybroxy-5-Methyl-isoxazole-4-Propionic Acid
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclic
APP	Amiloid Precursor Protein
AR	Adrenergic Receptor
AT	Angiotensin Receptor
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovine Serum Albumine
CAR1	Chemoattractive cAMP Receptor
CCKAR	Cholecystokinine A Type Receptor
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cyto Mégalovirus
COP	Coatomer Protein
CPT	8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine
CREB	cAMP Responsible Element Binding
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EBP50	ERM Binding Protein
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
ERM	Ezrin Radixin Moesin
FPV	Fowl Plague Virus
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GABA	γ-Amino Butyric Acid
GAIP	Ga Interacting Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GluR	Récepteur Glutamine
GlyR	Récepteur Glycine
GRK	G Protein-coupled Receptor Kinase
GST	Glutathion-S Transferase
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HA	Hemagglutinine
HBSS	Hank's Buffer Saline Solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HSP	Heat Shock Protein
IBMX	3 Isobutyl-1-Methylxanthine
INAD	Inactivation-No-Afterpotential D
IP3	Inositol-3 Phosphate
IPTG	Isopropyl ß-D Thiogalactopyranose
JNK	Jun N-terminal Kinase
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Lutheinizing Hormone
MAGUK	Membrane-Associated Guanylate Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDCK	Martin-Darby Canine Kidney
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate Receptor
nNOs	neural Nitric Oxyde Synthase
ONPG	O-Nitrophenyl ß-D-Galactopyranoside
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiestérase
PH	Pleckstrin Homology
pIgR	Human Epithelial Polymeric Immunoglobulin Receptor
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PORN	Poly-L-Ornithine
PSD-95	Post Synaptic Density-95
RGS	Regulatory of G-Protein Signaling
RIA	Radioimunoassay
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SAP-90	Synapse Associated Protein-90
SDS	Sodium Dodecy Sulfate
SFV	Semliki Forest Virus
SH3	Src-Homology 3
SRP	Signal Recognition Protein
SST	Somatostatine
TBS	Tris Buffer Saline
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
TRP	Transient Receptor Potential
TRPL	TRP Like
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus - Glycoprotein

TABLEAU DES COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUES

Les récepteurs de l'adénosine

Agoniste A_1

CPT, R(-)-PIA

Agoniste A_1, A_2

Adénosine

Antagoniste A_1

CGS-15943

Les récepteurs ß-adrénergiques

Agoniste $ß_2$

Isoprotérénol

Antagoniste $ß_2$

Propranolol

Les récepteurs de la dopamine

Agoniste D_1, D_2

6,7-ADTN, Apomorphine, Dopamine

Agoniste D_1

A-77636, SKF-38393, SKF-81297, SKF-82958

Agoniste D_2

Bromocriptine, Quinpirole, R(-)-NPA

Antagoniste D_1, D_2

Halopéridol

Antagoniste D_1

(-)-Butaclamol, SCH-23390, SCH-23982

Antagoniste D_{1C}

NNC 01-0012

Antagoniste Inverse D_1

(+)-Butaclamol, Chlorpromazine, cis-Flupenthixol, Fluphenazine, Halopéridol

Antagoniste D_2

Clozapine, Dompéridone, Spipérone, Sulpiride

TABLEAU DES TYPES CELLULAIRES

Lignée	Espèce	Type	Organe	Observations
13.S.1.24	Rat	Cellule Nerveuse	Muqueuse Olfactive	Transformée par l'antigène T
A431	Humain	Epithéliale	Peau	Carcinome
BHK	Hamster	Fibroblaste	Rein	
C6	Rat	Cellule Gliale	Cerveau	Gliome
CHO	Hamster	Epithéliale	Ovaire	
CHW	Hamster	Fibroblaste		
COS-1	Singe	Fibroblaste	Rein	Transformée par SV40
COS-7	Singe	Fibroblaste	Rein	Transformée par SV40
D384	Humain	Cellule Nerveuse	Medullo-surrénale	Astrocytome Exprime le récepteur D_{1A}
GH4C1	Rat	Cellule Nerveuse	Hypophyse	Cellules tumorales
HEK 293	Humain	Fibroblaste	Rein	Transformée par l'adénovirus de type 5
HeLa	Humain	Epithéliale	Uterus	Carcinome
LLC-PK1	Cochon	Epithélium	Rein	
Ltk-	Souris	Fibroblaste		Cellules sans thymidine kinase
MDCK	Chien	Epithéliale	Rein	
MMQ	Rat	Tumeur à prolactine	Hypophyse	Tumeur induite par les œstrogène Exprime le récepteur D_2
Neuro2A	Souris		Embryon	Neuroblastome
NG 108.15	Rat	Cellule Nerveuse	Hybride	Hybride neuroblastome N-18 et gliome C6
NIH-3T3	Souris	Fibroblaste	Embryon	
NS 20 Y	Souris	Cellule Nerveuse	Cerveau	Neuroblastome Exprime le récepteur D_{1A}
PC12	Rat	Cellule Nerveuse	Glande Surrénale	Phéochromocytome
Sf9	Insecte	Epithéliale	Ovaire	
SH-SY5Y	Humain	Cellule Nerveuse	Cerveau	Neuroblastome Exprime le récepteur A_{2A}, A_1
SK-N-MC	Humain	Cellule Nerveuse	Cerveau	Neuroblastome Exprime le récepteur D_{1A}
SK-N-SH	Humain	Cellule Nerveuse	Cerveau	Exprime le récepteur D_{1B}
Y79	Humain	Cellule Nerveuse	Rétine	Rétinoblastome Exprime le récepteur D_2

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Les principales voies dopaminergiques du système nerveux central des mammifères (d'après Björklund et Lindfall, 1984). 16
Figure 2 : Structure et fonctions comparées des récepteurs de la dopamine.....19
Figure 3 : Constantes de déplacements (Ki) pour les agonistes et antagonistes principaux des récepteurs de la dopamine. 21
Figure 4 : Alignement des séquences en acides aminés des récepteurs D_1 de la dopamine de plusieurs espèces représentatives de vertébrés. 23
Figure 5 : Les mutations artificielles introduites dans les séquences des récepteurs D_1.....25
Figure 6 : La définition des gènes paralogues et orthologues (d'après Vernier *et al*., 1993).....27
Figure 7 : Phylogénie des groupes actuels de vertébrés.....29
Figure 8 : Arbre phylogénétique simplifé des récepteurs des monoamines couplés aux protéines G (d'après Valdenaire et Vernier, 1997).....30
Figure 9 : Histoire évolutive des récepteurs D_1. 32
Figure 10 : Représentation schématique sagittale des localisations comparée des récepteurs D_1 dans le cerveau des vertébrés.....39
Figure 11 : Biosynthèse des récepteurs couplés aux protéines G. 43
Figure 12 : Polarité cellulaire et localisation des récepteurs couplés aux protéines G. 50
Figure 13 : Les différentes fonctions de la dimérisation.....52
Figure 14 : Les mutations qui modifient les propriétés de liaison des ligands des récepteurs D_1.58
Figure 15 : Les mutations qui modifient l'activité des récepteurs D_1. 59
Figure 16 : Transduction du signal et endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. 64
Figure 17 : Schéma récapitulatif des interconnexions entre les récepteurs couplés aux protéines G et les voies des MAPK. 72
Figure 18 : Désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G. 77
Figure 19 : Caractéristiques des protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). 82
Figure 20 : Internalisation de la cholécystokinine (CCK) couplée à des billes d'or dans des cellules CHO exprimant de façon stable les récepteurs de la CCK (d'après Roettger *et al*., 1995).....90
Figure 21 : La protéine GFP et ses variants. 98
Figure 22 : Construction des protéines de fusion récepteur D_1-GFP. 103
Figure 23 : Dosage de l'activité de l'adénylate cyclase. 109
Figure 24 : Dosage de l'accumulation d'AMPc. 111
Figure 25 : Comparaison de l'activité de l'adénylate cyclase après stimulation de 30 minutes par la forskoline de différents types cellulaires. 125
Figure 26 : Comparaison des quantités d'AMPc obtenues lors des dosages d'accumulation après stimulation des récepteurs, en fonction du taux d'expression du récepteur mesuré par le Bmax.....128
Figure 27 : Variations d'accumulation d'AMPc dans les cellules COS-7 sans récepteurs D_1.....129
Figure 28 : Profil de désensibilisation des sous-types du récepteur D_1 dans les cellules COS-7. 130
Figure 29 : La régulation de l'adénylate cyclase lors de la désensibilisation des récepteurs D_1. 132
Figure 30 : Interaction entre les voies de régulations de l'adénylate cyclase et des récepteurs D_1. 133

Figure 31 : Profils de désensibilisation des récepteurs sauvages D_1 dans les cellules de muqueuse olfactive 13.S.1.24. 135
Figure 32 : Profils de désensibilisation pour les chimères de récepteur D_1 dans lesquelles les séquences C-terminales ont été interchangées. 137
Figure 33 : Interventions des inhibiteurs de la PKA sur la désensibilisation des récepteurs D_1. 138
Figure 34 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en présence ou non de CGS-15943 dans le milieu. 140
Figure 35 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en absence de sérum de veau fœtal dans le milieu 141
Figure 36 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en présence d'adénosine déaminase dans le milieu de prétraitement. 142
Figure 37 : Analyses des interactions entre les récepteurs A_1 de l'adénosine et D_{1A} de la dopamine exprimés de façon stable dans les cellules Ltk- 144
Figure 38 : Tests des anticorps polyclonaux dirigés contre les sous-types du récepteur D_1 de xénope. 146
Figure 39 : Observations morphologiques de la désensibilisation du récepteur D_{1B} à l'aide d'un anticorps polyclonal dans les cellules COS-7. 148
Figure 40 : Graphique de corrélation des valeurs de Ki obtenues pour chaque sous-type du récepteur D_1 et sa protéine de fusion GFP correspondante. 151
Figure 41 : Comparaison des valeurs de Kd (M) en fonction du taux d'expression du récepteur mesuré par le Bmax. 153
Figure 42 : Comparaison de l'activité des récepteurs D_1 et des fusions avec la protéine GFP dans les cellules COS-7 par dosage de l'AMPc 155
Figure 43 : Profils de désensibilisation des récepteurs fusionnés à la protéine GFP dans les cellules COS-7. 157
Figure 44 : Distribution des protéines de fusion récepteurs D_1/GFP dans les cellules COS-7... 158
Figure 45 : Localisation de la protéine GFP seule dans les cellules COS-7 158
Figure 46 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation des protéines de fusion D_1-GFP dans les cellules COS-7 160
Figure 47 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation du récepteur D_{1A2}-GFP dans les cellules 13.S.1.24. 161
Figure 48 : Tests de différents composés sur la désensibilisation des récepteurs D_1-GFP dans les cellules COS-7. 163
Figure 49 : Variations d'accumulation d'AMPc dans les cellules HEK 293 sans récepteurs D_1. 164
Figure 50 : Distribution des protéines de fusion D_1-GFP dans les lignées stables HEK 293..... 167
Figure 51 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation des protéines de fusion D_1-GFP dans les lignées stables HEK 293. 168
Figure 52 : Western blot des récepteurs D_1 fusionnés à la GFP, révélés par un anticorps anti-GFP après immunoprécipitation de la GFP 169
Figure 53 : Dosage de l'accumulation d'AMPc dans des cultures primaires de neurones de striatum 171
Figure 54 : Western blot des différentes voies MAPK phosphorylées (ERK, JNK et p38), après activation des cellules HEK 293 sauvages et lignées stables contenant les sous-types du récepteur D_1-GFP 173
Figure 55 : Dosage de l'activité des MAPK (ERK1) dans les cellules COS-7 après électroporation des récepteurs D_1. 175
Figure 56 : Dosage de l'activité des MAPK (ERK1) dans les cellules COS-7 lors de la désensibilisation du récepteur D_{1C}. 177
Figure 57 : Dosage de l'incorporation de phosphate radiomarqué après immunoprécipitation de la MAPK ERK1 étiquetée HA dans les cellules COS-7 178

Tableau 1 : Grandes fonctions contrôlées par les transmissions dopaminergiques. 17
Tableau 2 : Tableau récapitulatif de toutes les séquences des récepteurs D_1 publiées à l'heure actuelle chez les vertébrés. 34
Tableau 3 : Le transport dans l'appareil de Golgi : maturation cisternale ou transport vésiculaire antérograde (d'après Warren et Malhotra, 1998). 45
Tableau 4 : Exemples de localisations polarisées des récepteurs à sept segments transmembranaires. 48
Tableau 5 : Rôle des protéines contenant des domaines PDZ dans les interactions avec les récepteurs (d'après Kim, 1997). 61
Tableau 6 : Exemples de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) contenant un domaine de liaison aux protéines à domaines PDZ potentiel (d'après Neubig, 1998). 62
Tableau 7 : Liste partielle des molécules enrichies dans les caveolae (d'après Anderson, 1998). 66
Tableau 8 : Implications démontrées des récepteurs couplés aux protéines G dans la formation des cancers humains (d'après Gutkind, 1998a; Gutkind, 1998b; van Biesen *et al*., 1996)....70
Tableau 9 : Expression de formes constitutivement actives de récepteurs impliquées dans des maladies (d'après Leurs *et al*., 1998) 74
Tableau 10 : Exemples de récepteurs couplés aux protéines G qui à l'état natif possèdent une activité constitutive élevée (d'après Arvanitakis *et al*., 1998; Pauwels et Wurch, 1998).....75
Tableau 11 : Comparaison entre les deux processus homologues et hétérologues de la désensibilisation (d'après Tobin, 1997). 78
Tableau 12 : Les récepteurs substrats des kinases des récepteurs couplés aux protéines G, GRK (d'après Carman et Benovic, 1998; Pitcher *et al*., 1998a). 83
Tableau 13 : Caractéristiques des membres de la famille des arrestines. 88
Tableau 14 : Conséquences de l'inhibition de l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G sur l'activité des kinases ERK (d'après Ceresa et Schmid, 2000). 92
Tableau 15 : Exemples de protéines fusionnées à la GFP.....100
Tableau 16 : Les oligonucléotides utilisés lors des différentes étapes du clonage. 104
Tableau 17 : Récapitulatif des différents clones de cellules HEK 293 exprimant de façon stable chacun des sous-types fusionné à la GFP. 165

INTRODUCTION

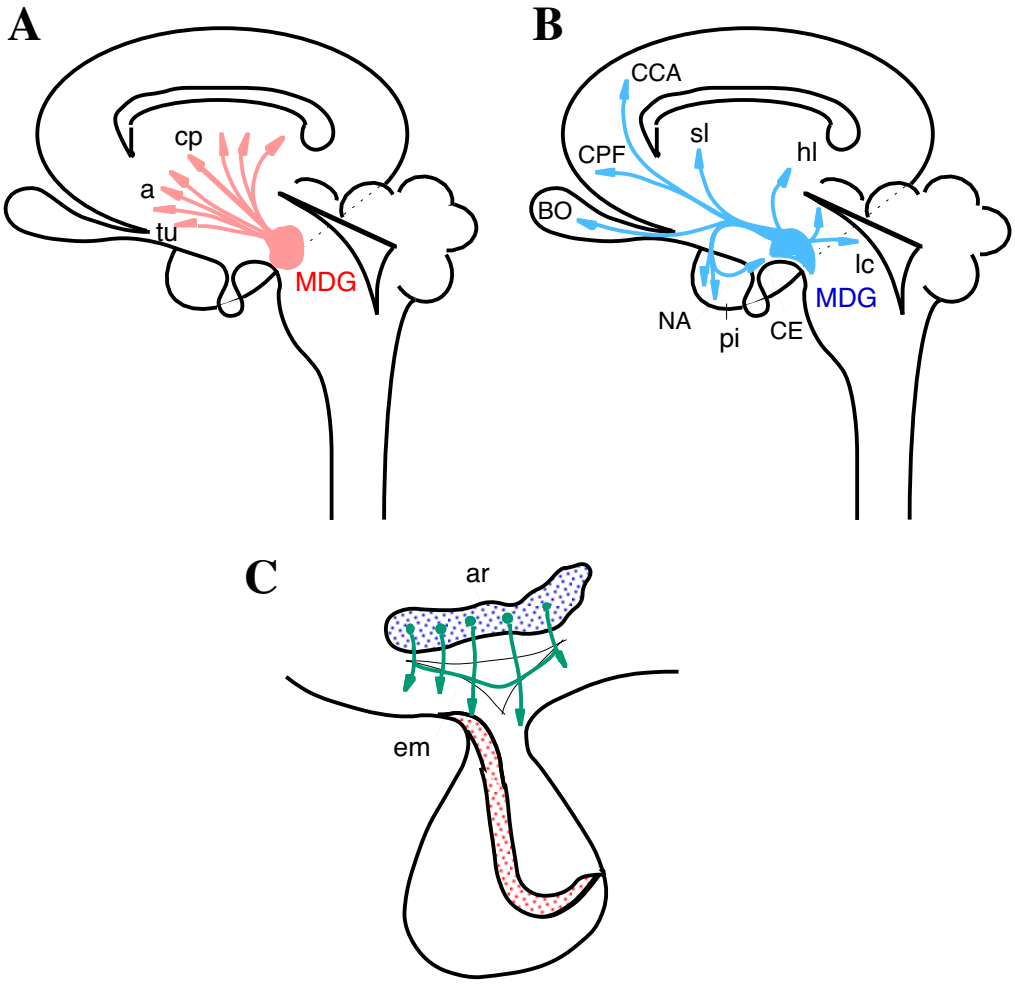


Figure 1 : Les principales voies dopaminergiques du système nerveux central des mammifères (d'après Björklund et Lindfall, 1984).

Représentation schématique des voies dopaminergiques : **A.** voie nigro-striatale, **B.** voie mésocorticolimbique et **C.** voie tubéro-infindibulaire. Abréviations : a, noyau accumbens; ar, noyau arqué; BO, bulbe olfactif; CCA, cortex cingulaire antérieur; CE, cortex enthorinal; cp, noyau caudé-putamen; CPF, cortex préfrontal; em, éminence médiane; hl, noyau latéral de l'habénula; lc, locus ceruleus; MDG, groupe mésencéphalique dopaminergique; NA, noyau amygdalien; pi, cortex piriforme; sl, noyau septal latéral et tu, tubercule olfactif.

I. Avant-propos

La dopamine participe à un grand nombre de fonctions du système nerveux comme la perception sensorielle (rétine et bulbe olfactif), la régulation de certaines hormones de l'hypophyse, la thermorégulation, la mémoire ou la motricité (Tableau 1). Cette catécholamine est largement distribuée dans le système nerveux central des vertébrés. A l'opposé des neuromédiateurs à action rapide (comme le glutamate, l'acétylcholine ou la glycine) qui se lient à des récepteurs canaux ioniques, la dopamine n'est pas impliquée dans la transmission synaptique directe. Il semble que son interaction avec des récepteurs spécifiques, permette de moduler l'excitabilité, le métabolisme, la mobilité ou la différenciation de la cellule. Bien que la dopamine soit très répandue chez les métazoaires, la plupart des connaissances sur son mode d'action nous vient de son étude chez les mammifères (Figure 1). La raison majeure est que la dopamine est impliquée dans un certain nombre de pathologies humaines, principalement des maladies psychiatriques comme la schizophrénie mais aussi l'accoutumance aux drogues, la maladie de Parkinson ou des prolactinomes de la glande hypophysaire.

Fonction	Système dopaminergique impliqué
Système nerveux central	
Thermorégulation	Périventriculaire-préoptique
Faim, soif	Incerto-hypothalamique
Motricité	Méso-limbique et méso-striatal
Eveil, attention, cognition et mémoire	Méso-cortical
Régulation de la pression artérielle	Incerto-hypothalamique
Sécretion de prolactine et d'hormone de croissance	Tubéro-infundibulaire
Vision	Cellules amacrines rétiniennes
Olfaction	Cellules périglomérulaires du bulbe olfactif
Système périphérique	
Contrôle végétatif	Groupe du tronc cérébral
Vomissement	Area postrema
Effet natriurétique	Tube contourné distal

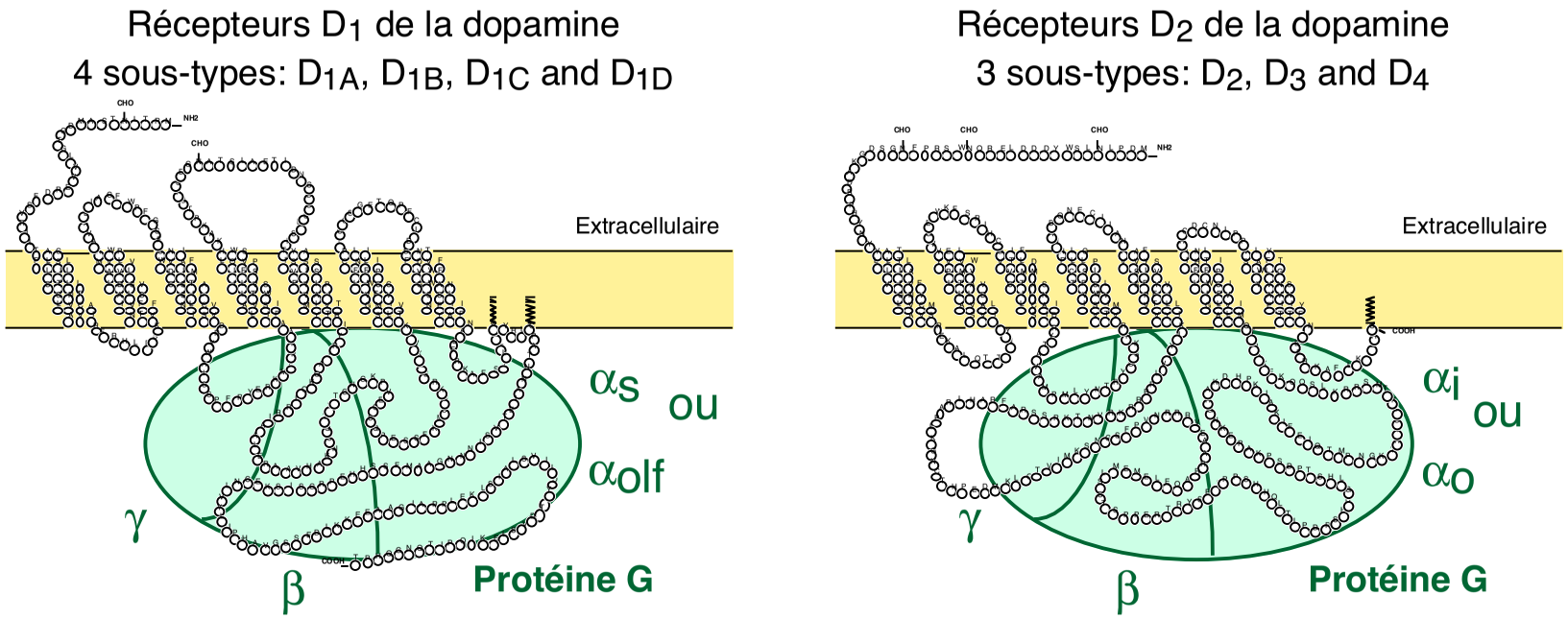
Tableau 1 : Grandes fonctions contrôlées par les transmissions dopaminergiques.

A l'échelle cellulaire, l'action d'un neurotransmetteur dépend de sa fixation sur des récepteurs membranaires spécifiques et de la transmission de ce signal à des voies de signalisation intracellulaire (transduction). Dans le cas de la dopamine, ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et se répartissent en deux classes dénommées D_1 et D_2. Les récepteurs de la classe D_1 comprennent eux-mêmes quatre sous-types chez les vertébrés (D_{1A}, D_{1B}/D_5, D_{1C} et D_{1D}). Malgré cette diversité, il est illusoire de

vouloir rapporter chacune des fonctions de la dopamine dans un organisme à un sous-type particulier. En effet, l'action cellulaire de chacun des sous-types du récepteur D_1 varie d'un type cellulaire à l'autre et l'effet qui en résulte dépend des interactions entre cellules d'un même réseau fonctionnel. L'isolement par clonage des différents sous-types du récepteur D_1 dans de nombreuses espèces de vertébrés a permis de reconstituer l'histoire évolutive des récepteurs D_1 de la dopamine (Chapitre II.B.3). Les sous-types D_{1A} et D_{1B} sont les plus conservés chez les vertébrés à mâchoires, alors que les sous-types D_{1C} et D_{1D} ne sont apparemment pas présents chez les mammifères.

Nous n'avons pas utilisé, comme c'est en général le cas pour cette famille de récepteurs, d'approche biochimique fondée sur la mutagenèse dirigée. En effet, un certain nombre de mutants ont été effectués chez les récepteurs D_1 et ils sont loin d'avoir permis d'obtenir des résultats probants. D'une part, il est toujours difficile de connaître la part réelle d'un changement de séquence par rapport aux modifications de conformation non spécifique qu'elles créent, et d'autre part il est possible que la substitution d'un seul acide aminé n'entraîne pas de transformation sensible. C'est pour cette raison que l'analyse phylogénétique comparée présente l'avantage d'étudier : (i) des modifications de séquences plus larges pour rechercher des régions conservées ou non entre les sous-types du récepteur D_1 et, (ii) de déterminer ainsi les ensembles d'acides aminés qui peuvent être fonctionnellement importants et spécifiques de chaque sous-type. Nous avons donc choisi d'adopter une analyse comparée et évolutionniste qui permet de déterminer les caractéristiques conservées ou dérivées pour chacun des sous-types du récepteur D_1. Cette analyse devait permettre d'identifier de véritables critères fonctionnels d'homologie pour comprendre comment et pourquoi, au cours de l'évolution des vertébrés, cette diversité de récepteurs a été maintenue. Les travaux présentés dans cette thèse posent les bases de l'identification des caractères fonctionnels grâce auxquels la multiplicité des récepteurs D_1 a conféré un avantage adaptatif aux espèces qui le possèdent.

Au cours de l'introduction, je présenterai tout d'abord les critères conventionnels de classification des récepteurs de la dopamine et l'apport des méthodes évolutives à la compréhension de leur histoire chez les vertébrés. Une fois cette diversité et son apparition mise en évidence, je m'attacherais à analyser comment un organisme peut avoir intérêt à maintenir une telle diversité en détaillant les différents paramètres pour lesquels il est possible de définir des homologies fonctionnelles. Ainsi je discuterais la localisation anatomique et subcellulaire des récepteurs, puis leurs rôles dans la modulation des signaux intracellulaires et enfin les différentes possibilités de régulation. Toutes ces informations permettront de visualiser les étapes clefs pour lesquelles un organisme peut utiliser plusieurs sous-types de récepteur.



Les principales voies de signalisation cellulaires

- Activation de l'adénylate cyclase	- Inhibition de l'adénylate cyclase
- Activation de la Phospholipase C	- Stimulation de la sortie de potassium
- Augmentation de l'entrée de calcium	- Inhibition de l'entrée de calcium
- Inhibition de l'échangeur Na+/H+	- Activation de l'ATPase Na+/K+ dépendante

L'organisation génique

- Pas d'introns dans la région codante	- Plusieurs introns dans la région codante - Phénomènes d'épissage alternatif

Figure 2 : Structure et fonctions comparées des récepteurs de la dopamine.

Les séquences en acides aminés présentées sont celles du récepteur D_{1A} et D_2 humain. Les groupements glycosylés (CHO) et palmitoylés qui ancrent le récepteur à la membrane (lignes brisées) sont représentés ainsi que .les différentes protéines G impliquées. Les principales caractéristiques de couplage et d'organisation génique de chacune des classes de récepteurs sont également indiquées.

II. Classification et histoire évolutive des récepteurs de la dopamine

II.A. La classification des récepteurs de la dopamine

Les premiers travaux entrepris sur les récepteurs de la dopamine portaient sur leurs propriétés pharmacologiques. Sur la base de profils de liaison d'agonistes et d'antagonistes, deux classes de récepteurs D_1 et D_2 ont été identifiées (Kebabian et Calne, 1979). Parallèlement à l'utilisation de composés discriminants chacune des classes de récepteur, la modulation des voies de transduction intracellulaire a également été un critère de différenciation. En effet, la classe D_1 est définie comme étant capable d'activer l'adénylate cyclase et de permettre l'accumulation d'AMPc alors que la classe D_2 au contraire inhibe son activité (Figure 2). Si cette différence fonctionnelle majeure a l'avantage d'être clairement identifiable et quantifiable dans la cellule, la détermination de profils pharmacologiques permet de différencier directement les récepteurs appartenant à chacune de ces classes. A l'heure actuelle, la famille des récepteurs de la dopamine est composée de sept récepteurs chez les vertébrés, quatre pour la classe D_1 (D_{1A}, D_{1B}/D_5, D_{1C} et D_{1D}) et trois pour la classe D_2 (D_2, D_3 et D_4), ayant chacun des propriétés particulières.

Le critère majeur de classification des récepteurs a été, et reste encore, la pharmacologie (pour revue voir Andersen *et al.*, 1990; Kebabian et Calne, 1979). Trouver des molécules qui distinguent entre elles les deux grandes familles D_1 et D_2 est simple. La dopamine possède une affinité micromolaire pour les récepteurs D_1 et nanomolaire pour les D_2. D'autre part, le SCH-23390 est le prototype de l'antagoniste spécifique des récepteurs D_1 et la famille des SKF (SKF-38393, SKF-81297…) celle des agonistes D_1. Pour la classe D_2, le quinpirole et la bromocriptine représentent des agonistes classiques alors que la dompéridone et le spipérone sont des antagonistes spécifiques. Par contre, sans vouloir passer en revue de façon exhaustive toutes les molécules capables de moduler l'activité des récepteurs, il reste difficile de trouver des composés discriminant les différents récepteurs à l'intérieur de chaque classe (Figure 3). Pour la classe D_1 par exemple, le récepteur D_{1B} a été caractérisé par sa plus forte affinité pour la dopamine, son ligand naturel.

La discrimination des sous-types D_{1C} et D_{1D} est pharmacologiquement beaucoup plus difficile. De toutes les molécules testées jusqu'à présent, seul un composé de la famille des benzazépines de seconde génération est capable de discriminer le récepteur D_{1C}. Cette molécule, le NNC 01-0012 (7-chloro-8-hydroxy-1-(2-naphtyl)-2,3,4,5-tet-rahydro-1H-3-benzazepine), peut différencier pharmacologiquement et fonctionnellement les membres de la famille D_1 (Sugamori *et al.*, 1998a). En mesurant l'inhibition de la liaison du ^{3}H-SCH-23390 par ce composé, le récepteur D_{1C} a une affinité de 10 à 20 fois supérieure à celle des récepteurs D_{1A}, D_{1B} ou D_{1D}.

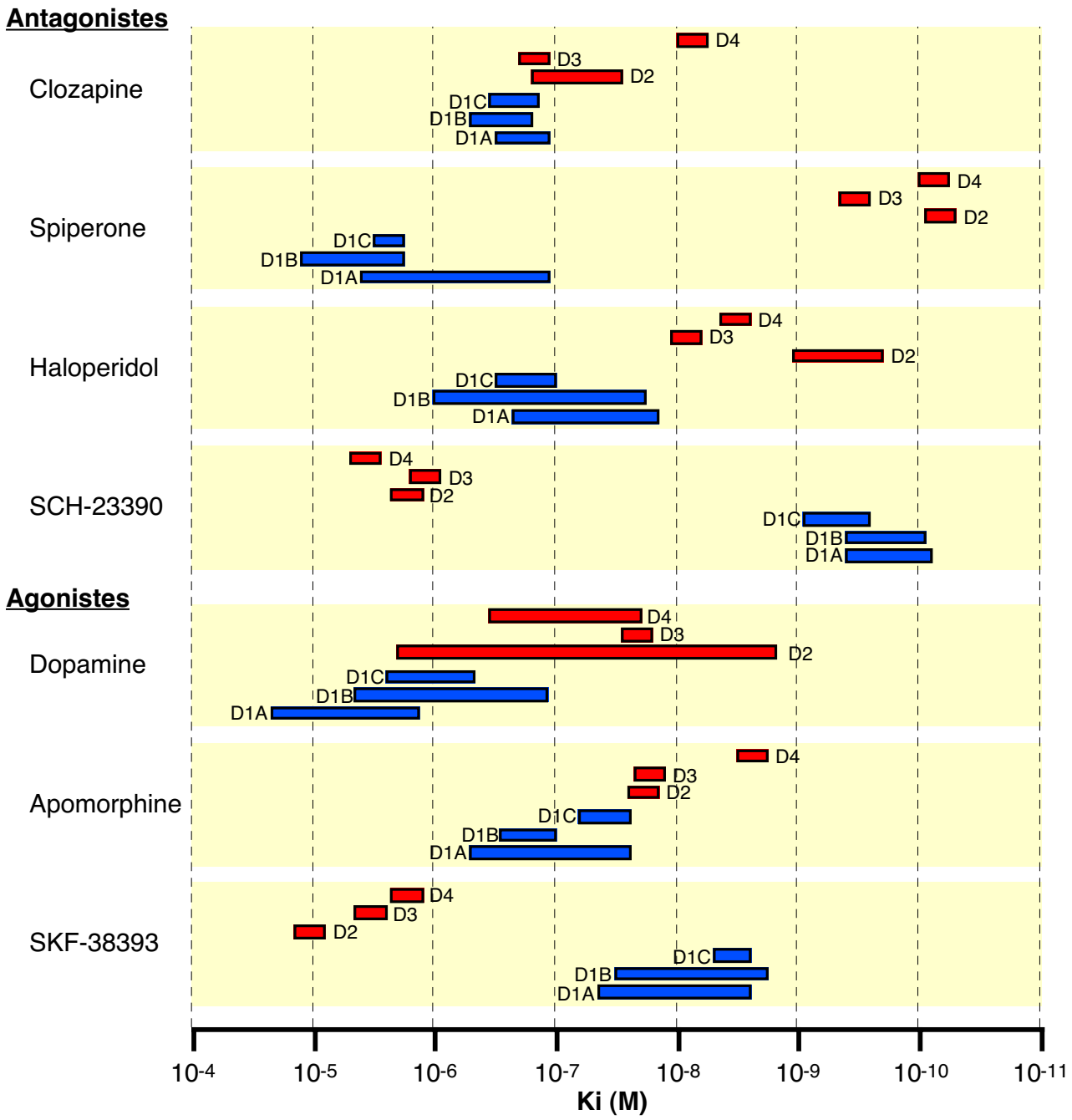


Figure 3 : Constantes de déplacements (Ki) pour les agonistes et antagonistes principaux des récepteurs de la dopamine.

Les valeurs de Ki (M) des récepteurs de diverses espèces : homme, rat, anguille et xénope, sont représentées sur ce diagramme en utilisant les différentes valeurs données par la littérature (Cardinaud *et al*., 1997; Gingrich et Caron, 1993; Ogawa, 1995; Sokoloff *et al*., 1993; Sugamori *et al*., 1994). Les Ki des récepteurs D_1 sont représentés par des barres bleues et ceux des récepteurs D_2 par des barres rouges.

D'un point de vue fonctionnel, cette molécule inhibe complètement l'accumulation d'AMPc par la dopamine pour le récepteur D_{1C}, alors qu'il ne l'inhibe que de 60% pour le D_{1A} et de 50% pour le D_{1B}.

L'ensemble de ces données pharmacologiques reflète bien les difficultés rencontrées lorsque l'on utilise les différences d'affinité entre récepteurs pour les classifier les uns par rapport aux autres.

La plupart de nos connaissances de la nature moléculaire des récepteurs de la dopamine provient de leur isolement à partir de banques d'ADN complémentaires (ADNc) ou génomiques. L'analyse de leur séquence les classe dans la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de sept hélices hydrophobes traversant la membrane plasmique. C'est la famille de protéines qui s'est adaptée à la liaison du plus grand nombre de molécules au cours de l'évolution : photons, ions, odeurs, acides aminés, nucléotides, protéines… Elle compte plus d'un millier de membres (1% du génome humain). On estime a l'heure actuelle qu'ils sont la cible de 60% des médicaments (Bockaert et Pin, 1999). La conservation importante des séquences de ces récepteurs, particulièrement dans les régions transmembranaires, est à l'origine des stratégies de clonage choisies pour les isoler (pour revue voir Gingrich et Caron, 1993). L'utilisation de la technique de PCR avec des amorces dégénérées ou le criblage de banque d'ADNc en conditions permissives ont ainsi permis d'isoler chez un grand nombre d'espèces les récepteurs de la dopamine. Ces méthodes ont aussi révélé des différences d'organisation génique puisque si les récepteurs D_1 n'ont pas d'introns, les récepteurs D_2 en possèdent (Figure 2).

Grâce aux séquences, on peut modéliser la structure de ces récepteurs (pour revue voir Civelli *et al*., 1993; O'Dowd, 1993). Si les segments transmembranaires sont bien conservés, les régions intra et extracellulaires sont beaucoup plus variables (Figure 4). Les récepteurs D_1 possèdent une longue extrémité C-terminale cytoplasmique et une troisième boucle cytoplasmique courte. A l'opposé, les récepteurs D_2 ont une extrémité C-terminale très courte mais une troisième boucle cytoplasmique beaucoup plus longue. Ces deux régions interviennent dans un certain nombre de régulations de l'activité du récepteur, la plus importante est le couplage aux protéines G. Ce couplage est d'ailleurs un autre moyen de différencier ces récepteurs. En effet, les récepteurs D_1 sont associés préférentiellement à la sous-unité $G\alpha_S$ des protéines G alors que les récepteurs D_2 sont associés principalement aux protéines $G\alpha_i/G\alpha_o$ (Figure 2).

L'information contenue dans les séquences de ces récepteurs peut être utilisée comme critère de classification. Cette classification phylogénétique présente un certain nombre

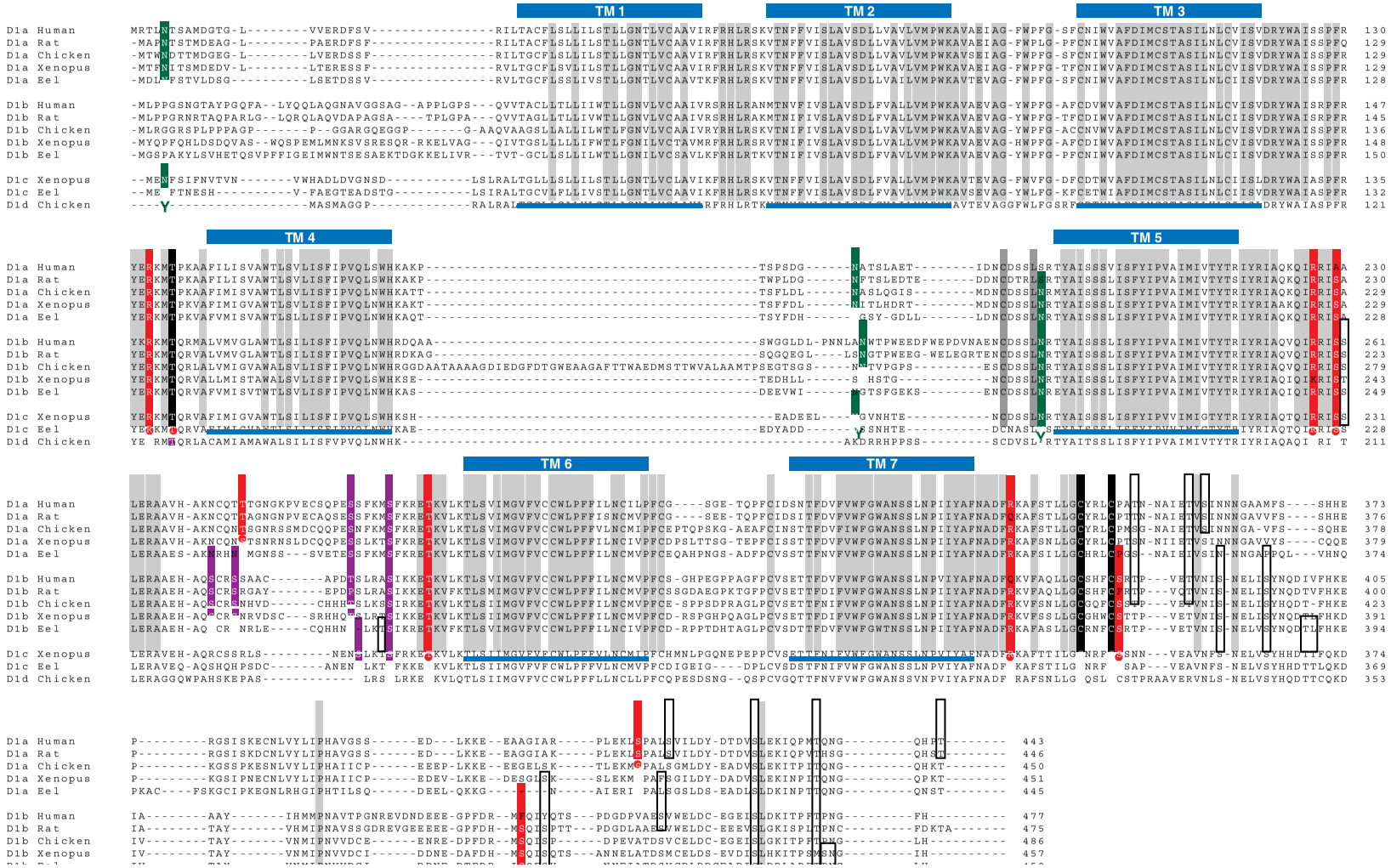


Figure 4 : Alignement des séquences en acides aminés des récepteurs D_1 de la dopamine de plusieurs espèces représentatives de vertébrés.

Les alignements des séquences des récepteurs D_1 d'homme (D_{1A} : P21728, D_{1B} : P21918), de rat (D_{1A} : P18901, D_{1B} : P25115), de poulet (D_{1A} : A55886, D_{1B} : B55886, D_{1D} : C55886), de xénope (D_{1A} : P42289, D_{1B} : P42290, D_{1C} : P42291) et d'anguille (D_{1A2} : U62919, D_{1B} : U62920, D_{1C} : U62921) ont été obtenus avec le programme clustalX (Thompson *et al.*, 1997). Les segments transmembranaires (TM) sont figurés au-dessus des séquences. Les résidus conservés pour tous les sous-types parmi toutes les espèces sont soulignés par une boîte grisée. Les résidus N-glycosylés (Y) et palmitoylés (Δ sont indiqués en dessous des séquences. Les sites consensus de phosphorylation par la PKA (●) et la PKC (■) ont été identifiés en utilisant les bases Prosite ProfileScan (http://www.expasy.ch/prosite/) et PhosphoBase (Kreegipuu *et al.*, 1999). Dans les rectangles ouverts sont indiquées d'autres sérine et thréonine conservées et pouvant être phosphorylées.

d'avantages par rapport aux données pharmacologiques basées sur les profils d'affinité qui sont utilisés plus classiquement. En effet, les informations contenues dans les séquences sont sans ambiguïté et dégagées des considérations expérimentales. Ce contenu offre ainsi un critère de classement théoriquement “absolu”. Les classifications pharmacologiques ne permettent de séparer que des caractères déjà identifiés, et ne favorisent donc pas la découverte de récepteurs à fonctions nouvelles. La comparaison de séquences reste plus précise puisqu'elle se base sur le nombre de sites informatifs qu'elles contiennent. En revanche, si c'est un outil puissant de classification, il ne fournit aucun renseignement sur la manière dont les récepteurs fonctionnent.

Au cours de l'évolution, l'apparition d'une famille de gène est le résultat de deux forces principales et opposées exerçant leur effet sur l'ADN génomique. La première est la tendance qu'a le génome à se dupliquer et à rapidement accumuler des mutations. La deuxième est la nécessité absolue d'une conservation de séquence suffisante pour permettre les fonctions vitales d'un organisme dans un milieu donné. Ces deux forces contribuent à la génération de nouveaux gènes dans de nouvelles espèces et à leur adaptation face aux changements de leur environnement. Dans la partie suivante, nous allons voir comment est reconstituée l'histoire évolutive des familles de gènes comme celle des récepteurs D_1 chez les vertébrés afin de mettre en évidencela diversité de ces récepteurs.

II.B. Histoire évolutive des récepteurs de la dopamine

L'utilisation combinée de techniques de biologie moléculaire et cellulaire s'est beaucoup développée ces dernières années pour être appliquée à l'étude de l'activité des récepteurs. En général, ces techniques ne renseignent que sur les relations structure/fonction et n'apportent que peu de données sur le rôle physiologique des récepteurs dans l'organisme entier. L'importance de la mutagenèse effectuée sur ces récepteurs en est l'exemple le plus flagrant (voir les bases de données de mutants des récepteurs couplées aux protéines G: http://www-grap.fagmed.uit.no/GRAP/homepage.html et http://mgddk1.niddk.nih.gov:8000/Mutation Analysis.html, Herz *et al*., 1997 et Figure 5). Cependant, comprendre la fonction du récepteur, c'est étudier son association dans la cellule avec les différents partenaires impliqués dans la transduction du signal. C'est aussi analyser son rôle à une échelle différente, celle des cellules exprimant ces récepteurs et celle de l'organisme. D'un point de vue fonctionnel, les contraintes évolutives majeures s'expriment à l'échelle de l'individu pour le maintien de son intégrité. L'aspect évolutif est donc indispensable à prendre en compte pour comprendre comment la multiplicité génétique des récepteurs de la dopamine a été générée.

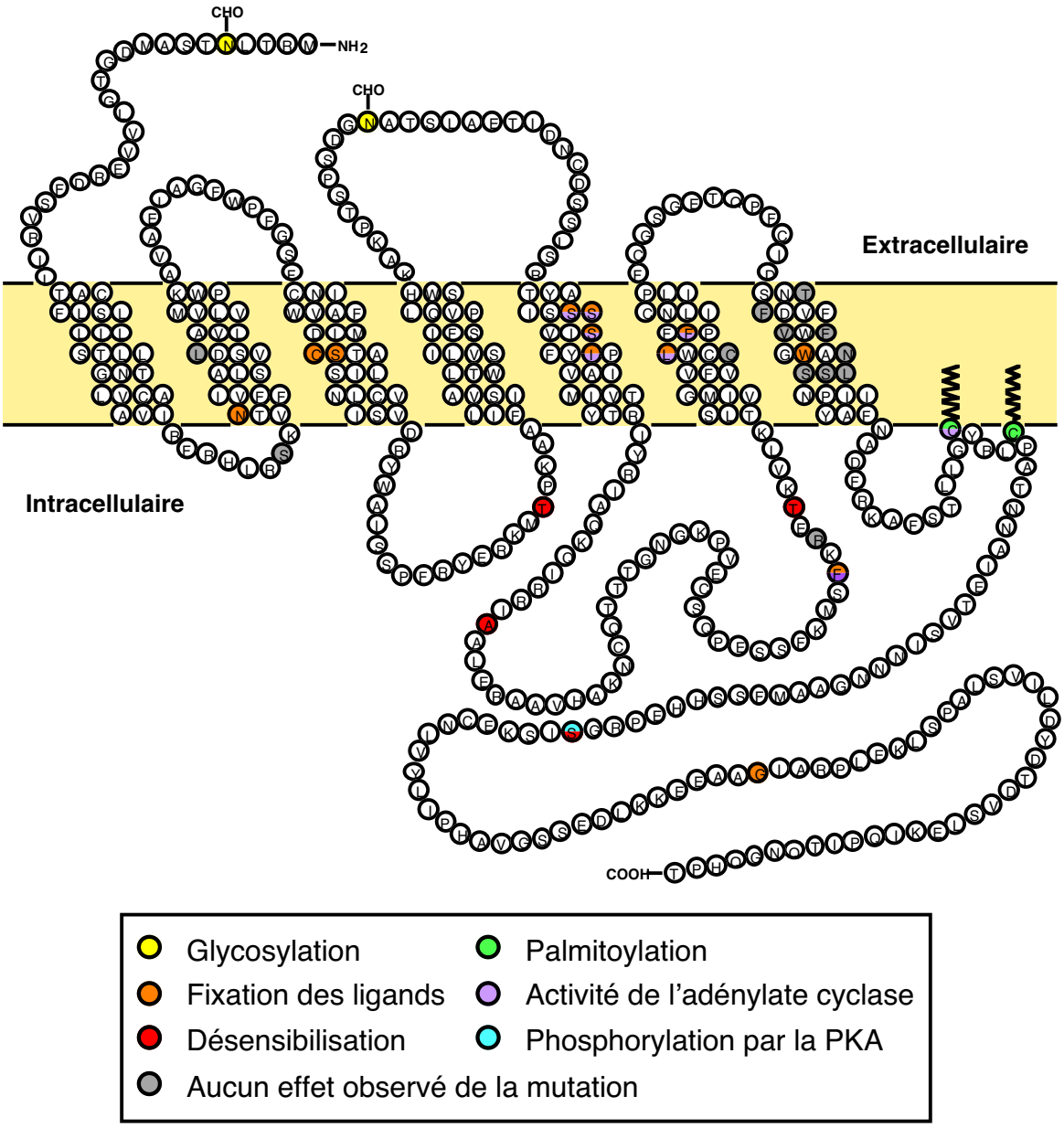


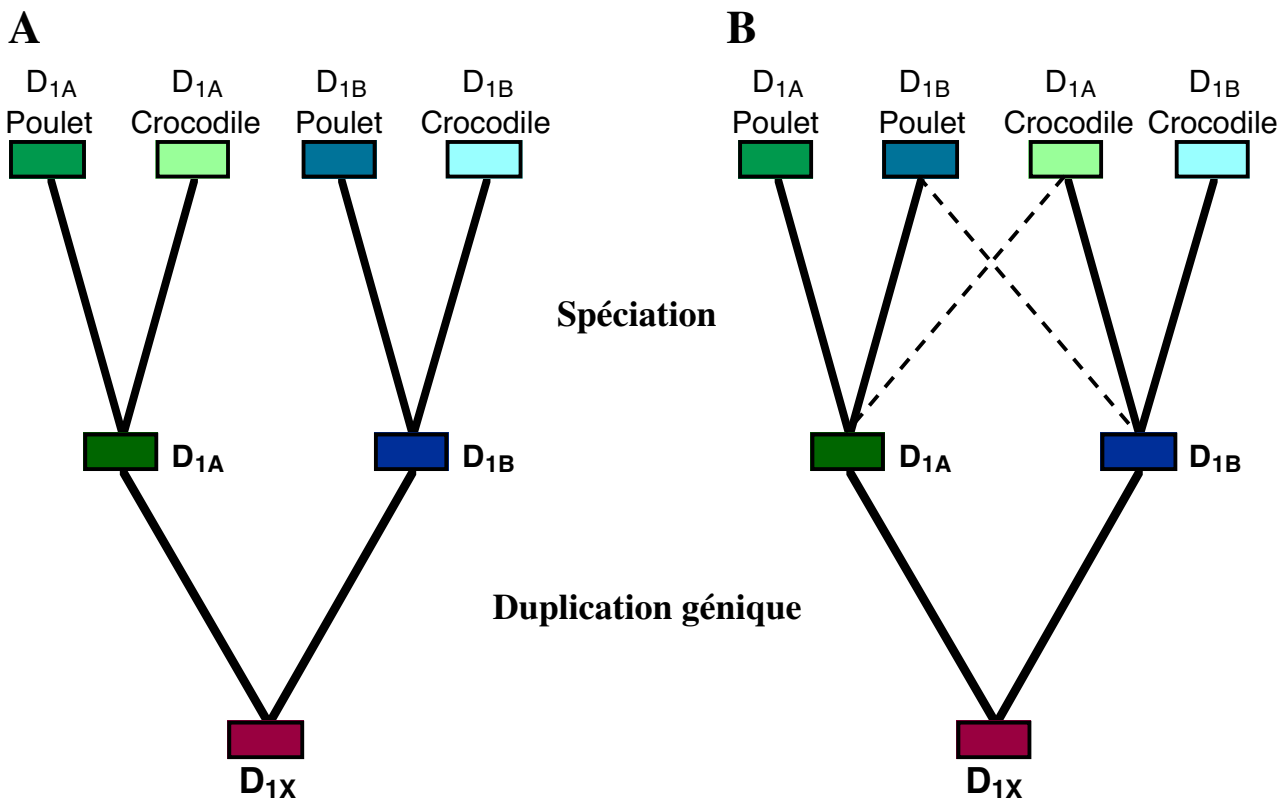
Figure 5 : Les mutations artificielles introduites dans les séquences des récepteurs D_1.

Sur cette figure sont présentes toutes les mutations obtenues pour les récepteurs D_1 ainsi que la caractéristique ou la propriété qu'elles affectent. Les sites intervenants dans plusieurs propriétés sont indiqués avec les couleurs correspondantes. La séquence est celle du récepteur D_{1A} humain car c'est sur ce récepteur qu'a été faite la majorité des analyses mutationnelles. Cependant, lorsque les mutations concernent les récepteurs D_{1A} de rat ou D_{1B} humain, les acides aminés de substitution ont été choisis en remplacement en accord avec l'alignement des séquences (Figure 4). Des détails plus précis sur chaque mutation sont donnés dans le texte et dans les Figure 14 et Figure 15. Ces mutations proviennent des travaux suivants: (Cho *et al*., 1996; Demchyshyn *et al*., 2000; Jensen *et al*., 1996; Jensen *et al*., 1995; Jiang et Sibley, 1999; Jin *et al*., 1998; Jin *et al*., 1999; Jin *et al*., 1997; Karpa *et al*., 1999; Pauwels et Wurch, 1998; Pollock *et al*., 1992; Sibley *et al*., 1998; Tomic *et al*., 1993)

II.B.1. Les méthodes d'analyse évolutive

La multiplicité des récepteurs couplés aux protéines G chez les vertébrés reflète sans aucun doute l'évolution de cette famille de gènes. Cependant, il est très difficile de faire la part entre les effets induits aléatoirement par la diversification moléculaire et les contraintes imposées par le milieu, soit la part réelle de l'adaptation fonctionnelle. L'apparition de multiples récepteurs est due à des mécanismes de duplication génique. Une grande quantité de mutations ponctuelles peut alors affecter chaque copie du gène après la duplication pour arriver à la différenciation de deux gènes frères ou gènes paralogues (Figure 6). Le plus souvent cette dérive génétique entraîne l'inactivation d'une des deux copies redondantes du gène pour donner un pseudogène. Pour être conservés, les gènes doivent donc échapper à cette inactivation. L'acquisition de nouvelles propriétés fonctionnelles, d'une localisation spatiale spécifique ou d'une expression temporelle différentielle, permet ainsi de conserver le gène paralogue dans toutes les espèces dérivées de l'ancêtre où a eu lieu la duplication. Il faut que ces mutations soient fixées à l'intérieur de l'espèce c'est-à-dire que tous les individus acquièrent ces mutations pour qu'elles soient observables aujourd'hui. Ajouté à ces phénomènes généraux touchant un grand nombre d'espèces, il existe un second mécanisme générateur de diversité génétique. Lorsqu'une certaine population voit ses conditions de vie se modifier de façon indépendante, par un phénomène de séparation géographique par exemple, les caractéristiques génétiques de cette population vont alors évoluer de façon différente. Ce phénomène appelé “spéciation” aboutit à la création de gènes orthologues, soit les mêmes gènes mais dans des espèces différentes. En conclusion, la duplication des gènes aboutit à la création des classes et sous-types (gènes paralogues) alors que la spéciation différencie des gènes entre espèces strictement homologues (gènes orthologues). Les récepteurs dupliqués ont donc nécessairement divergé avant la spéciation et se retrouvent dans toutes les espèces chez l'ancêtre à partir duquel la duplication a eu lieu. Ces propriétés peuvent alors servir de base pour la construction d'une classification des récepteurs basés sur des relations évolutives.

Les espèces actuelles contiennent dans leur génome des séquences héritées d'un ancêtre commun. De telles séquences sont dites homologues. Les arbres phylogénétiques sont obtenus à partir de la comparaison des gènes homologues. Dans le cas où le gène utilisé appartient à une famille multigénique, il peut être difficile de différencier les spéciations des duplications. L'étude des paralogues est donc un élément très important pour comprendre l'évolution des génomes.



Quelques types d'homologies moléculaires :

Homologue	Gènes provenant d'un ancêtre commun (exemple, tous les récepteurs D_1).
Orthologue	Gènes homologues qui ont divergé entre eux après un événement de spéciation (les récepteurs D_{1A} de poulet et de crocodile).
Paralogue	Gènes homologues qui ont divergé entre eux après un phénomène de duplication génique (récepteurs D_{1A} et D_{1B} par exemple)

Figure 6 : La définition des gènes paralogues et orthologues (d'après Vernier *et al*., 1993).

A. La duplication génique du gène D_{1X} donne deux paralogues D_{1A} et D_{1B}. Après fixation des caractères, un phénomène de spéciation intervient qui maintient dans les deux espèces (poulet et crocodile) les caractères D_{1A} et D_{1B}. Les gènes D_{1A} de poulet et de crocodile sont donc orthologues. **B.** Souvent, les remaniements géniques rendent difficile l'établissement de relations phylogénétiques. Elles peuvent aboutir à des relations fausses si les séquences de poulet sont plus ressemblantes entre elles qu'entre les paralogues (conversion génique). La relation correcte est indiquée en pointillés.

II.B.2. L'évolution des cordés

Avec les vertébrés, d'autres animaux sont classés dans le phylum des cordés. Bien qu'il n'aient pas de vertèbres ou toutes les autres caractéristiques spécifiques des vertébrés, certains éléments tendent à les rapprocher des vertébrés. Parmi les cordés, les animaux les plus proches des vertébrés sont les céphalocordés comme l'amphioxus (*Branchiostoma*). Encore en amont, on trouve d'autres animaux : les urocordés, qui possèdent les mêmes caractéristiques de filtration tout en ayant une vie fixée (ascidies, tuniciers). Les observations des fossiles semblent indiquer que tous ces groupes d'animaux ont émergé en même temps lors de la grande radiation du Cambrien.

Les premiers vertébrés connus ne possèdent pas de mâchoires (agnathes, Figure 7). Ils sont surtout retrouvés sous formes de fossiles (ostrachodermes) jusqu'à l'époque du Dévonien (360-408 millions d'années). En fait deux groupes modernes de cette lignée existent encore, ce sont les lamproies (petromyzontiformes) et les myxines (myxiniformes). Après de nombreuses controverses, on s'accorde à placer les myxines avant les lamproies dans l'évolution des vertébrés (Rasmussen *et al*., 1998). On peut alors parler de craniâtes, groupe qui contient les myxines et les vertébrés au sens strict. Les premiers fossiles de vertébrés à mâchoires (gnathostomes) sont apparus durant le Silurien (408-438 millions d'années) et se divisent en deux groupes les acanthodiens et placodermes. Durant le Dévonien, de nouveaux groupes de vertébrés sont apparus alors que les deux précédents ont commencé à s'éteindre: les poissons cartilagineux (chondrichtyens) et les poissons à squelette osseux (osteichtyens). Les osteichtyens vont alors très vite se diviser en deux catégories: les actinopterygiens ou poissons à nageoires rayonnantes et les sarcopterygiens à nageoires soutenues par des os. Le premier groupe s'est énormément développé à partir du Crétacé (65-144 millions d'années) et est à l'origine de l'abondance des téléostéens. Les sarcoptérygiens ont continué à évoluer en donnant les dipneustes et les crossoptérygiens qui durant le permien sont à l'origine des tétrapodes (Figure 7).

On peut facilement expliquer l'absence de fossiles utilisables pour établir des parentés entre phylums. En effet, il a fallu peu de temps pour que surgissent des animaux bâtis suivant des plans d'organisation très différents (Conway Morris, 2000). La faune de Burgess révèle cette explosion de la vie animale qui s'est produite il y a environ 530 millions d'années juste avant le Cambrien, au début de l'ère primaire. La plupart des phylums existants apparurent à cette époque en 5 à 10 millions d'années. Ce laps de temps est très court comparé aux 3 milliards d'années d'évolution à partir de la première cellule pour aboutir aux premiers métazoaires (Denis et Collenot, 1995). En règle générale, les estimations de l'échelle des événements sont obtenues à l'aide des données paléontologiques (fossiles). Des analyses récentes ont permis, grâce au grand

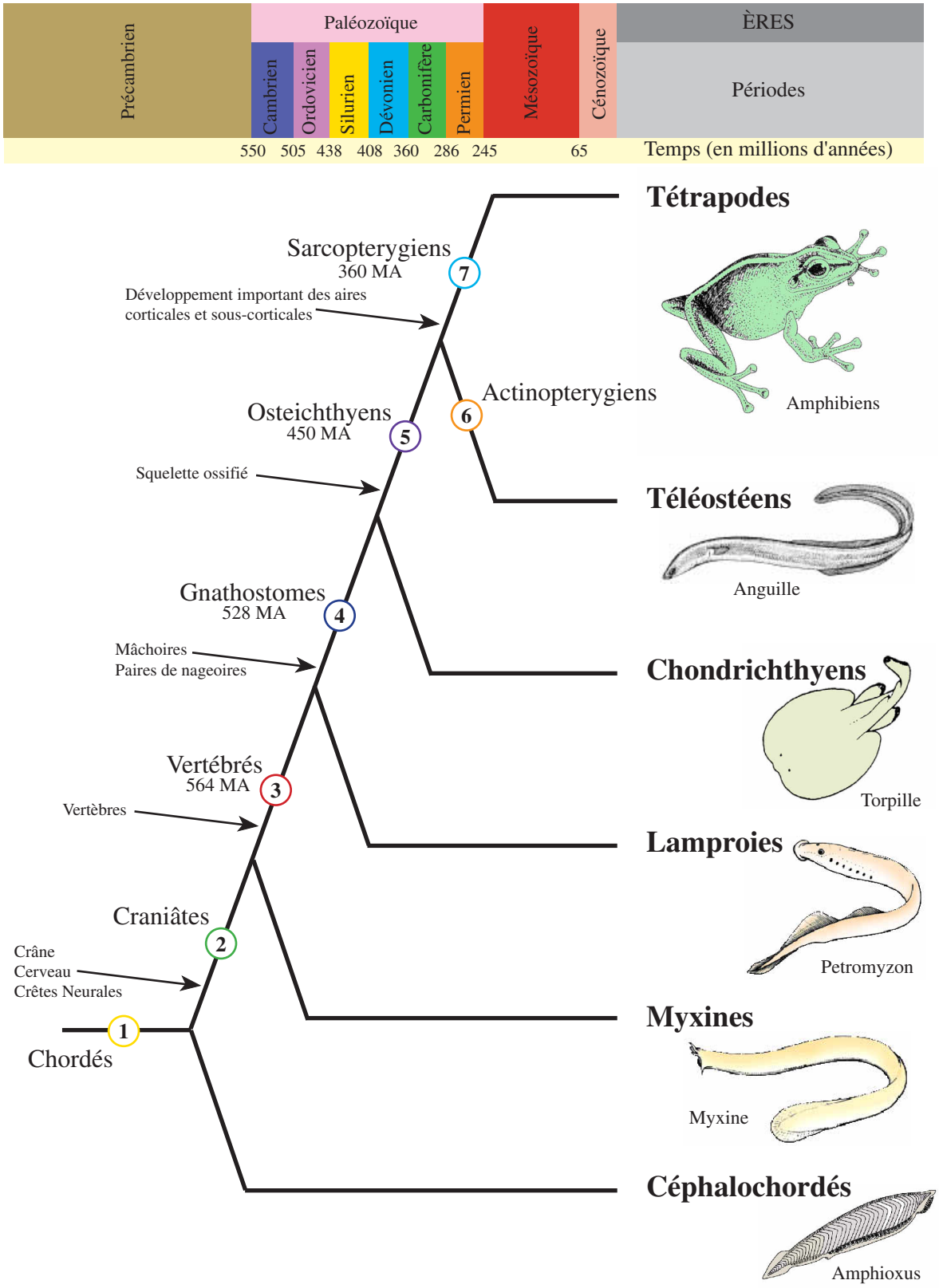


Figure 7 : Phylogénie des groupes actuels de vertébrés.

Sur cette figure sont représentées les relations évolutives entre les principaux groupes de vertébrés. Chaque numéro indique une étape importante de l'évolution des vertébrés avec au bout des flèches les inventions anatomiques marquantes. Les dates données sur l'arbre le sont à partir du calcul des distances phylogénétiques (Kumar et Hedges, 1998) en millions d'années.

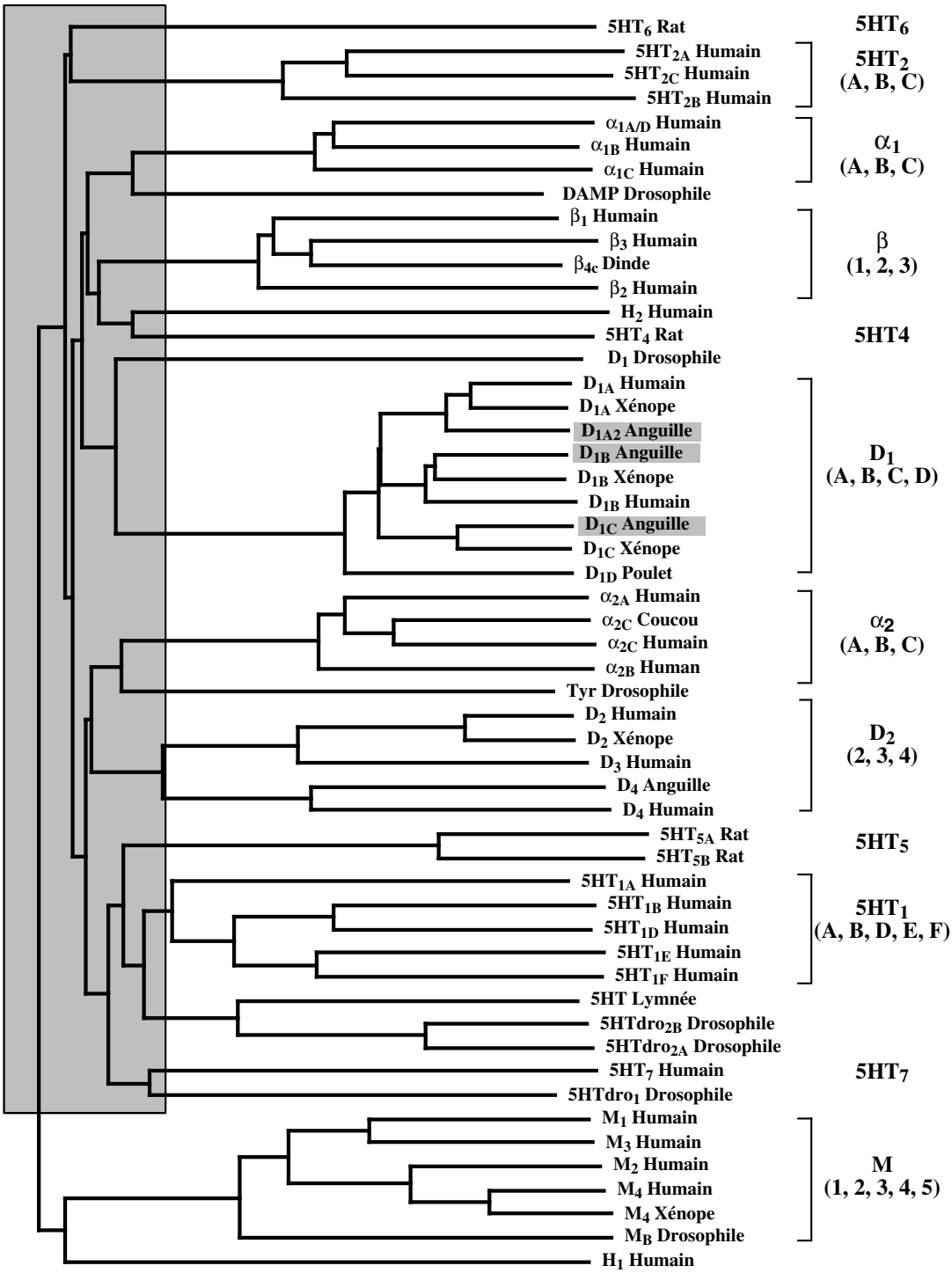


Figure 8 : Arbre phylogénétique simplifé des récepteurs des monoamines couplés aux protéines G (d'après Valdenaire et Vernier, 1997).

Les séquences choisies pour cet alignement sont majoritairement humaines appartenant aux principaux groupes de récepteurs aux bioamines. Les grandes classes et sous-classes de récepteurs sont indiquées à droite. Toutes les branches incluses dans la boîte grise n'ont pas de position robuste et l'on ne peut donc pas en déduire les relations réelles entre groupes. Ainsi, un certain nombre de séquences d'invertébrés ne peuvent pas être situées avec certitude. Les classes de récepteurs qui fixent le même ligand ne sont pas plus proches entre elles qu'avec les autres classes de récepteurs des monoamines.

nombre de séquences aujourd'hui disponibles, d'évaluer les temps d'évolution (Kumar et Hedges, 1998). Même si la notion d'horloge moléculaire est incorrecte lorsque l'on s'intéresse à une seule famille de gène, elle peut être généralisable avec un grand nombre de gènes. Ainsi ces analyses replacent l'origine des vertébrés en accord avec les fossiles soit vers 530 millions d'années (pour revue voir Zimmer, 2000). Sur le même principe, la divergence oiseaux/crocodiles est placée vers 240 millions d'années et celle des amphibiens vers 360 millions d'années (Figure 7).

II.B.3. Histoire évolutive des récepteurs D_1 chez les vertébrés

Comprendre quelles sont les contraintes qui sont à l'origine de la structure et la de fonction des récepteurs couplés aux protéines G permet de rendre compte des raisons physiologiques de leur diversité moléculaire. Pour obtenir la vision la plus précise possible de ces phénomènes, il est nécessaire d'isoler les classes et sous-types dans le plus grand nombre d'espèces représentatives de l'évolution des vertébrés. A l'heure actuelle, une telle étude n'a été développée qu'en partie pour les récepteurs ß-adrénergiques et dans notre laboratoire pour les récepteurs D_1 de la dopamine. Certains résultats partiels obtenus pour d'autres récepteurs permettent de confirmer nos conclusions. Si l'on remonte à l'origine des récepteurs des bioamines, il semble que l'on retrouve, soit des récepteurs crées *de novo* à partir de duplication de gène en même temps que l'apparition des vertébrés, soit des récepteurs ayant divergé à partir d'une forme présente chez les invertébrés (Figure 8). Le calcul des distances phylogénétiques révèle deux périodes majeures dans l'évolution des récepteurs des bioamines. La première apparaît avec la séparation des arthropodes des vertébrés au précambrien et correspond à l'apparition des principaux sous-types de récepteurs des bioamines. La seconde est apparue il y a 400 millions d'années et aurait accompagné la céphalisation du système nerveux des vertébrés.

Comme nous l'avons vu, la structure et les fonctions des deux grandes classes de récepteurs de la dopamine D_1 et D_2 sont très dissemblables. Chacune de ces classes est issue d'un gène ancestral différent (Fryxell, 1995), et l'organisation génique vient renforcer cette idée. La capacité commune à fixer la dopamine est une propriété acquise plus tard au cours de l'évolution de ces récepteurs. Cette propriété convergente est obtenue de façon indépendante sans qu'il soit possible de donner une date dans l'apparition de cette capacité (Vernier *et al.*, 1995). L'observation d'arbres phylogénétiques de l'évolution des récepteurs couplés aux protéines G montre ainsi que ces deux classes de récepteurs ne sont pas plus proches l'une de l'autre que des autres types de récepteurs (Vernier *et al.*, 1993).

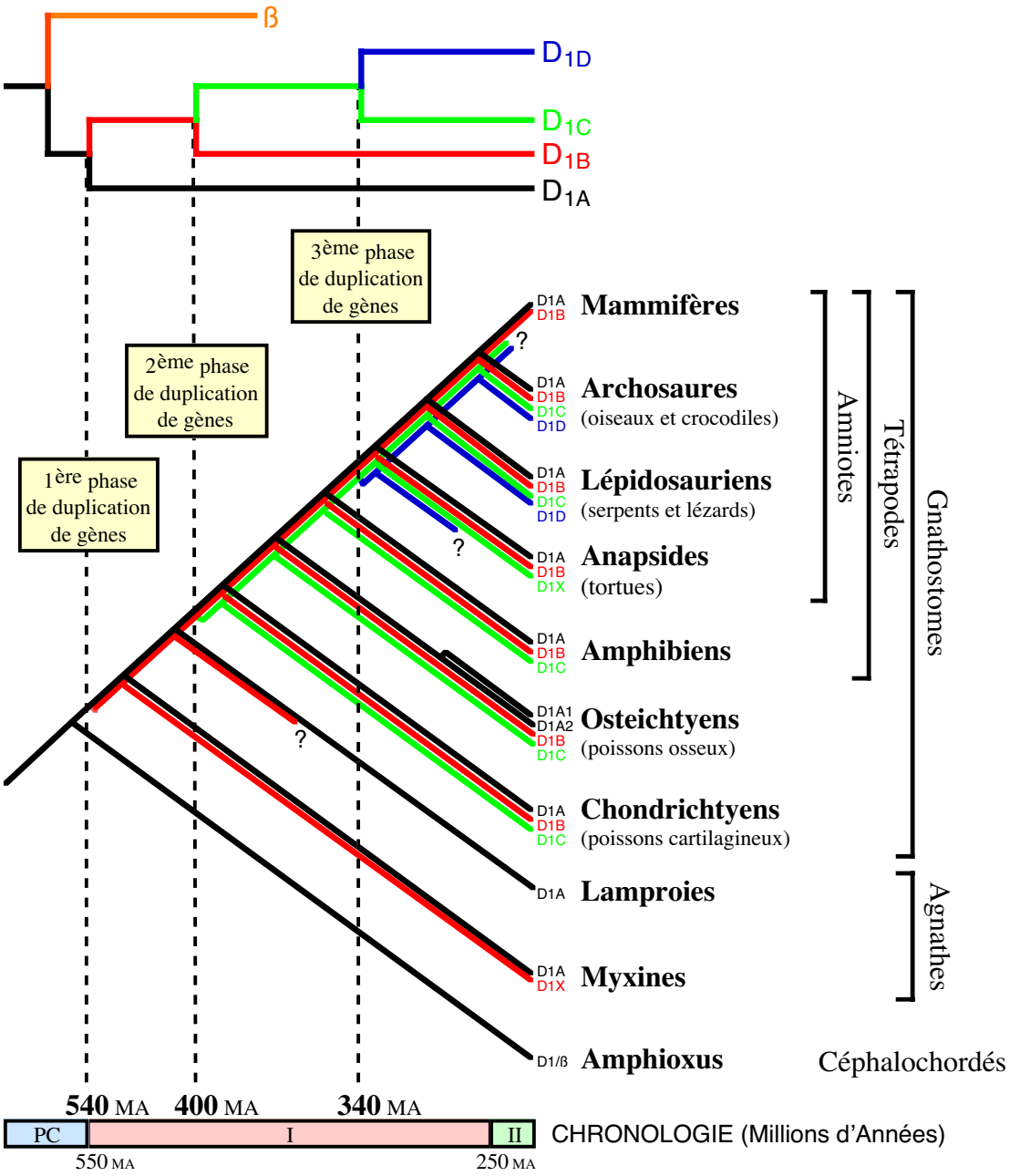


Figure 9 : Histoire évolutive des récepteurs D_1.

Cette histoire évolutive est reconstruite à l'aide des arbres phylogénétiques obtenus après alignements des séquences des récepteurs D_1 (voir Tableau 2). Les principales étapes de duplication sont indiquées sur le schéma avec au-dessus de l'arbre, le cladogramme de l'apparition des principaux sous-types du récepteur D_1. Les dates en millions d'années (MA) sont données à titre indicatif et sont basées sur les fossiles et les calculs de distances phylogénétiques. PC : Précambrien, I : Paléozoïque (primaire) et II : Mésozoïque (secondaire).

L'absence d'intron et le nombre de plus en plus important d'espèces pour lesquelles les séquences des récepteurs D_1 sont connues (Tableau 2) nous a conduit à nous intéresser à l'apparition des différents sous-types du récepteur D_1 chez les vertébrés. La phylogenèse des récepteurs D_1 et les mécanismes évolutifs que l'on peut en déduire ont été étudiés en détail chez les craniâtes en comparant le nombre et la nature des gènes codant pour les récepteurs de la classe D_1 (Figure 9). Deux principales étapes de duplication de gènes ont produit les trois sous-types majeurs (D_{1A}, D_{1B} et D_{1C}) présents chez tous les vertébrés à mâchoires (Gnathosotomes), à l'exception des mammifères (Cardinaud *et al.*, 1998). Ces duplications sont survenues avant l'apparition des premiers gnathostomes représentés par les poissons cartilagineux (Chondrichtyens). La première duplication reste difficile à dater avec précision. En effet, les myxines, dont on admet aujourd'hui que les ancêtres sont apparus avant ceux des lamproies (Zimmer, 2000), possèdent deux gènes codant des récepteurs D_1. L'un de ces gènes ressemble clairement au sous-type D_{1A} commun aux gnathostomes alors que l'autre ne ressemble à aucun autre sous-type connu. Par contre, les lamproies ne possèdent qu'un seul récepteur D_1 apparenté au D_{1A} des gnathostomes. Il n'est pas possible de savoir précisément si un gène de récepteur D_1 a été perdu chez les lamproies ou si les myxines ont développé une duplication qui leur est propre. Les deux grandes duplications majeures se retrouvent pour beaucoup d'autres familles de gènes de vertébrés à mâchoires et sont visiblement la conséquence de la tétraploïdisation du génome entier car elles sont retrouvées pour d'autres familles de gènes comme ceux exprimés lors du développement (Holland et Garcia-Fernàndez, 1996). D'autres duplications plus spécifiques sont intervenues par la suite dans certains groupes de vertébrés. Chez les poissons téléostéens une duplication particulière du récepteur D_{1A} en deux sous-types D_{1A1} et D_{1A2} est observée (Cardinaud *et al.*, 1997). Et surtout chez les amniotes où une nouvelle duplication du gène D_{1C} est à l'origine de l'apparition du sous-type D_{1D} présent chez les oiseaux mais aussi les tortues et les lézards (Figure 9).

L'hypothèse la plus simple quant à l'évolution de cette famille de gène est donc d'imaginer que le maintien des nouveaux gènes dupliqués est contraint par des conditions spécifiques. En fait lors de la mise en place d'une duplication de gène, la fonction gobale de l'ancêtre est conservée soit par l'intermédiaire des deux gènes soit chez l'un des deux gènes dupliqués, ce qui est le cas des récepteurs D_1. Ces modifications sont alors fixées dans le génome dès lors qu'elles sont utilisées pour permettre l'adaptation des organismes qui l'expriment. Ajoutée à cette fonction adaptative, l'acquisition de localisations séparées des différentes copies est aussi un mécanisme de conservation important.

Récepteur	Espèce	Numéro d'accession	Référence
D_{1A}	Humain	X58987	Zhou *et al.*, 1990
	Macaque	M90313	Sealfon, 1991
	Opossum	S67258	Nash *et al.*, 1993
	Cochon	U25681	Grenader *et al.*, 1995
	Bœuf	U73042	Verseaux-Botteri *et al.*, 1997
	Rat	M35077	Monsma *et al.*, 1990
	Souris	L20336	Wilkie *et al.*, 1993
	Lapin	Y10662	Bairam *et al.*, 1998
	Poulet	L36877	Demchyshyn *et al.*, 1995
	Xénope	U07863	Sugamori *et al.*, 1994
	Fugu	X80174	Macrae et Brenner, 1995
	Poisson Rouge	L08602	Frail *et al.*, 1993
D_{1A1}	Anguille	U62918	Cardinaud *et al.*, 1997
D_{1A2}	Anguille	U62919	Cardinaud *et al.*, 1997
D_{1A3}	Carpe	Y14626	Hirano *et al.*, 1998
D_{1A4}	Carpe	Y14627	Hirano *et al.*, 1998
D_{1B}	Humain	X58454	Sunahara *et al.*, 1991
	Macaque	*Q95195*	Choi *et al.*, 1995
	Rat	M69118	Tiberi *et al.*, 1991
	Bœuf	U73043	Verseaux-Botteri *et al.*, 1997
	Poulet	L36878	Demchyshyn *et al.*, 1995
	Xénope	U07864	Sugamori *et al.*, 1994
	Carpe	Y14629	Hirano *et al.*, 1998
	Anguille	U62920	Cardinaud *et al.*, 1997
D_{1C}	Xénope	U07865	Sugamori *et al.*, 1994
	Tilapia	X81969	Lamers *et al.*, 1996
	Carpe	Y14628	Hirano *et al.*, 1998
	Fugu	X80177	Macrae et Brenner, 1995
	Anguille	U92921	Cardinaud *et al.*, 1997
D_{1D}	Poulet	L36879	Demchyshyn *et al.*, 1995
D_{1X}	Carpe	Y14631	Hirano *et al.*, 1998

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de toutes les séquences des récepteurs D_1 publiées à l'heure actuelle chez les vertébrés.

Tous les numéros d'accession font référence à la base GenBank mis à part pour le récepteur D_{1B} de Macaque (en italique) où il s'agit du numéro d'accès à la base SwissProt.

Comprendre les fonctions des récepteurs est fondamental pour permettre de comparer de façon précise et efficace les différents gènes de récepteur trouvés. En effet, les méthodes de comparaison par similitude de séquences possèdent de nombreuses limitations (Eisen, 1998). Dans le cas de duplications multiples de gènes, il n'est pas toujours facile de distinguer les gènes orthologues des gènes paralogues. Les méthodes basées sur les similitudes sont très peu efficaces quand les taux de variations importants sont combinés à la duplication génique et il n'est pas

toujours possible d'obtenir d'histoire évolutive précise. Les reconstructions phylogénétiques doivent donc tenir compte de ces considérations et se baser sur un échantillonage d'espèces suffisant. Les problèmes rencontrés dans ces analyses par similarité sont clairement visibles dans l'analyse des regroupements de gènes Hox. En effet, la découverte de 7 regroupements de gènes Hox chez le danio (zebrafish), alors que le nombre de 4 semblait général chez les vertébrés, a laissé penser que les rongeurs comme la souris avaient perdu 2 de ces regroupements (Meyer, 1998). Or, des analyses sur un plus grand nombre d'espèces montre qu'en fait ces animaux ont subi une tétraploïdisation générale à l'origine de cette profusion de regroupement de gènes.

Les nouveaux récepteurs apparus durant l'évolution des vertébrés ont été maintenus pour des besoins fonctionnels spécifiques. La conservation des séquences permettant les classifications phylogénétiques ont donc des contreparties fonctionnelles. La découverte des conséquences biochimiques de la diversité des récepteurs D_1 de la dopamine est requise pour comprendre pourquoi ces récepteurs ont été conservés et qu'elles sont leurs fonctions. Dans les parties suivantes, je passerais en revue les propriétés biochimiques, la localisation et les régulations qui caractérisent les récepteurs de la dopamine et qui pourraient expliquer pourquoi il y a autant de récepteurs différents chez les vertébrés.

III. Localisation des récepteurs D_1 de la dopamine

III.A. Les récepteurs D_1 de la dopamine dans le système nerveux central

L'une des raisons les plus importantes pour lesquelles des gènes de récepteurs dupliqués peuvent être conservés dans des groupes d'espèces est celle de l'acquisition d'une localisation différente dans l'organisation du système nerveux. En effet, dès lors que deux récepteurs ne sont pas présents dans la même région ou au même endroit dans la cellule qui les exprime, ils ne peuvent pas être complètement redondants. Cette remarque souligne d'emblée l'importance de la localisation pour le rôle physiologique que jouent les récepteurs dans un organisme. Dans des cellules aussi différenciées que des neurones, un récepteur de neurotransmetteur contrôlera des aspects distincts des fonctions neuronales selon qu'il est présent dans les terminaisons nerveuses, dans le corps cellulaire ou dans les dendrites. De même, le rôle d'un récepteur pré-synaptique est différent de celui d'un récepteur post-synaptique, et il sera encore différent s'il est situé directement dans la synapse ou à l'extérieur. Il est donc indispensable de pouvoir analyser la localisation cellulaire des récepteurs à l'aide d'anticorps spécifiques, si l'on veut mieux comprendre quels rôles peuvent jouer chacun des sous-types des récepteurs de la dopamine par exemple. Malheureusement, jusqu'à une date récente, il n'existait pas d'anticorps capables de

distinguer sans ambiguïté chacun des sous-types du récepteur D_1, obligeant à utiliser d'autres techniques, moins précises à l'échelon cellulaire, comme l'autoradiographie des récepteurs et l'hybridation *in situ*.

III.A.1. Localisation régionale

L'analyse de la distribution régionale et plus encore de la localisation cellulaire précise des récepteurs de la dopamine a été fortement tributaire des méthodes qui ont été développées dans ce but. La première technique a avoir été utilisée pour détecter les deux classes de récepteurs dopaminergiques a été la visualisation par autoradiographie de la liaison de ligands radioactifs sur des coupes de tissus.

a. L'autoradiographie des sites de liaison des récepteurs de la dopamine dans le cerveau

L'intérêt des méthodes autoradiographiques est limité par la sélectivité et les caractéristiques physico-chimiques des molécules utilisées (Creese *et al.*, 1983). Néanmoins, ces techniques ont permis d'identifier assez précisément les principales régions-cibles des systèmes de neurotransmission dopaminergiques, dans le cerveau des mammifères. Les récepteurs de la classe D_2, dont la distribution a été principalement analysée par l'autoradiographie de la liaison du ^{3}H-spipérone et du ^{125}I-sulpride, sont assez largement distribués dans le cerveau. La grande majorité des sites de liaison de ces récepteurs se concentre principalement dans le noyau caudé, le putamen et la substance noire. Mais on en trouve aussi des quantités importantes dans le bulbe olfactif, le tubercule olfactif, l'hypothalamus postérieur et dans l'hypophyse antérieure (cellules à prolactine).

La distribution des sites de liaisons des récepteurs de la classe D_1 a été étudiée essentiellement à l'aide du ^{3}H-SCH-23390 ou du ^{125}I-SCH-23982. Les récepteurs D_1 sont aussi les plus abondants dans le striatum (noyau caudé et putamen) où ils se retrouvent dans les neurones GABAergiques qui contiennent aussi de la substance P et qui projettent sur la substance noire. Des quantités importantes de ces sites de liaison ont été identifiées dans l'ensemble du cortex principalement dans les aires antérieures. Des taux modérés de sites de liaison D_1 sont observés dans l'hippocampe, l'amygdale et dans le diencéphale avec une certaine concentration dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus et dans le noyau réticulaire du thalamus. Dans le mésencéphale, les sites de liaison des récepteurs D_1 sont observés dans la substance noire. Enfin, il existe un marquage modéré dans les cellules de Golgi de la couche granulaire du cervelet, mais aussi dans certaines cellules de Purkinje. Il n'existe, à notre connaissance que trois études publiées sur la localisation des sites de liaison des récepteurs D_1

dans des espèces différentes des mammifères, et elles concernent toutes les trois des oiseaux. Pour être bref, ces travaux montrent d'une manière générale, que la localisation des récepteurs D_1 est fortement conservée entre les oiseaux et les mammifères. En effet, chez la caille (Ball *et al.*, 1995) et chez le poulet (Schnabel *et al.*, 1997), la plus forte densité de récepteurs D_1 a été également observée dans les régions homologues du striatum. Enfin, chez les étourneaux (Casto et Ball, 1994) on trouve une forte densité de récepteurs D_1 dans une aire qui présente un dimorphisme sexuel marqué dans cette espèce, et qui pourrait jouer un rôle dans le chant et la parade nuptiale qui sont particulier aux oiseaux.

En conclusion, ces études autoradiographiques ont démontré l'existence d'une régionalisation des récepteurs D_1 et D_2 qui correspond exactement aux zones de projections des voies neuronales dopaminergiques (Figure 1 et Figure 10). La localisation massive des récepteurs dans les noyaux qui synthétisent la dopamine (substance noire pour les récepteurs D_2, ou noyaux hypothalamiques pour les récepteurs D_1) suggère aussi qu'ils puissent agir comme récepteurs pré-synaptiques ou même comme des autorécepteurs dans certaines structures comme le striatum. En revanche, malgré quelques tentatives, la description de la distribution de chacun des sous-types de récepteurs D_1 ou D_2 dans le système nerveux central a été principalement réalisée par la technique d'hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques.

b. Distribution des transcrits codants les récepteurs de la dopamine dans le système nerveux central des vertébrés

La difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques des sous-types des récepteurs de la dopamine a conduit la plupart des auteurs à privilégier l'hybridation *in situ* sur coupes de tissus pour analyser la régionalisation de ces sous-types. Chez les mammifères, il existe paradoxalement peu d'études claires et exhaustives de la localisation des transcrits de récepteurs de la dopamine. Pour les récepteurs de la classe D_1, les travaux les plus complets sont ceux de Mansour et *al.* (Mansour *et al.*, 1991) et de Schambra et *al.* (Schambra *et al.*, 1994) pour les récepteurs D_{1A} et de Tiberi et *al.* (Tiberi *et al.*, 1991) pour les récepteurs D_{1B}. D'une manière générale, la distribution des transcrits est très semblable de celle des sites de liaison décrits par autoradiographie. Néanmoins, ces études ont permis de montrer que, chez les mammifères, le sous-type D_{1A} est de loin le plus abondant (Figure 10). La prédominance des localisations striatales pour le sous-type D_{1A} est évidente. En revanche, il n'y a pas d'ARNm D_1 dans la substance noire, ce qui révèle que les sites de liaison qui étaient observés correspondent à des récepteurs synthétisés dans les neurones striataux et transportés jusqu'aux terminaisons de ces neurones. La présence du sous-type D_{1B} dans les aires striatales est discutée et semble varier d'une espèce à l'autre chez les mammifères. Absent chez l'homme, il serait présent à un taux

faible chez le rat et principalement dans le noyau accumbens. Dans les régions corticales, les deux sous-types semblent colocalisés dans les couches profondes du cortex. Le sous-type D_{1B} est clairement prédominant dans l'hippocampe et pour le diencéphale, dans le noyau parafasciculaire du thalamus. Dans l'hypothalamus, en l'absence de comparaison directe, il est difficile de savoir exactement quelle proportion de chacun des deux sous-types est exprimée, mais leur localisation est fortement semblable et prédomine dans les noyaux supraoptiques, paraventriculaires et suprachiasmatiques.

Mise à part la localisation des sous-types D_{1A} et D_{1B} chez les mammifères, la première analyse de la diversité de répartition des différents sous-types du récepteur D_1 chez d'autres espèces a été effectuée par Northern blot contre les ARNm de différentes régions du cerveau d'anguille (Cardinaud *et al.*, 1997). Le récepteur D_{1A2} est ainsi le plus abondant, mais chaque sous-type semble avoir des localisations un peu différentes. Ainsi le récepteur D_{1A1} est présent dans toutes les régions avec une prédominance pour le tronc cérébral. Le récepteur D_{1A2} semble très faiblement présent dans l'hypophyse et le cervelet. Le D_{1B} quant à lui est majoritaire dans le diencéphale et absent de l'hypophyse. Enfin le D_{1C} possède une localisation, analysée grossièrement de cette manière, proche du D_{1A2}. Une étude comparée plus précise par hybridation *in situ* de la localisation des ARNm des sous-types D_1 chez l'anguille (Kapsimali *et al.*, 2000) montre qu'effectivement les localisations se recoupent largement entre les sous-types avec une expression graduée $D_{1A2}>D_{1B}>>D_{1C}$. Les régions marquées sont le télencéphale (bulbe olfactif et télencéphale dorsal), le diencéphale (thalamus, hypothalamus, noyau préoptique et tectum optique) et le cervelet. Seuls le diencéphale et le cervelet possèdent un marquage D_{1C}. Le sous-type D_{1A} est le plus abondant, le récepteur D_{1B} est moins représenté mis à part dans le télencéphale ventro-latéral. On le retrouve également dans quelques régions où le récepteur D_{1A} n'est pas présent tel que l'équivalent du colliculus inférieur des mammifères. Enfin le sous-type D_{1C} est exprimé de façon restreinte dans l'hypothalamus dorsal, l'habenula et le cervelet. Les marquages D_{1A2} et D_{1A1} quant à eux se recoupent très largement.

L'analyse de la localisation de l'expression du gène rapporteur lacZ sous le contrôle du promoteur du gène D_{1A} humain a été mené chez la souris (Severynse *et al.*, 1995). Les régions marquées sont le noyau caudé, le putamen, le thalamus, l'amygdale, le cortex cérébral, l'hippocampe et l'hypothalamus. Si cette localisation semble correspondre celle du récepteur D_{1A} dans le système nerveux central, l'observation détaillée dans différentes régions comme le striatum indique que des modifications post-traductionnelles doivent affecter la localisation précise de ces récepteurs.

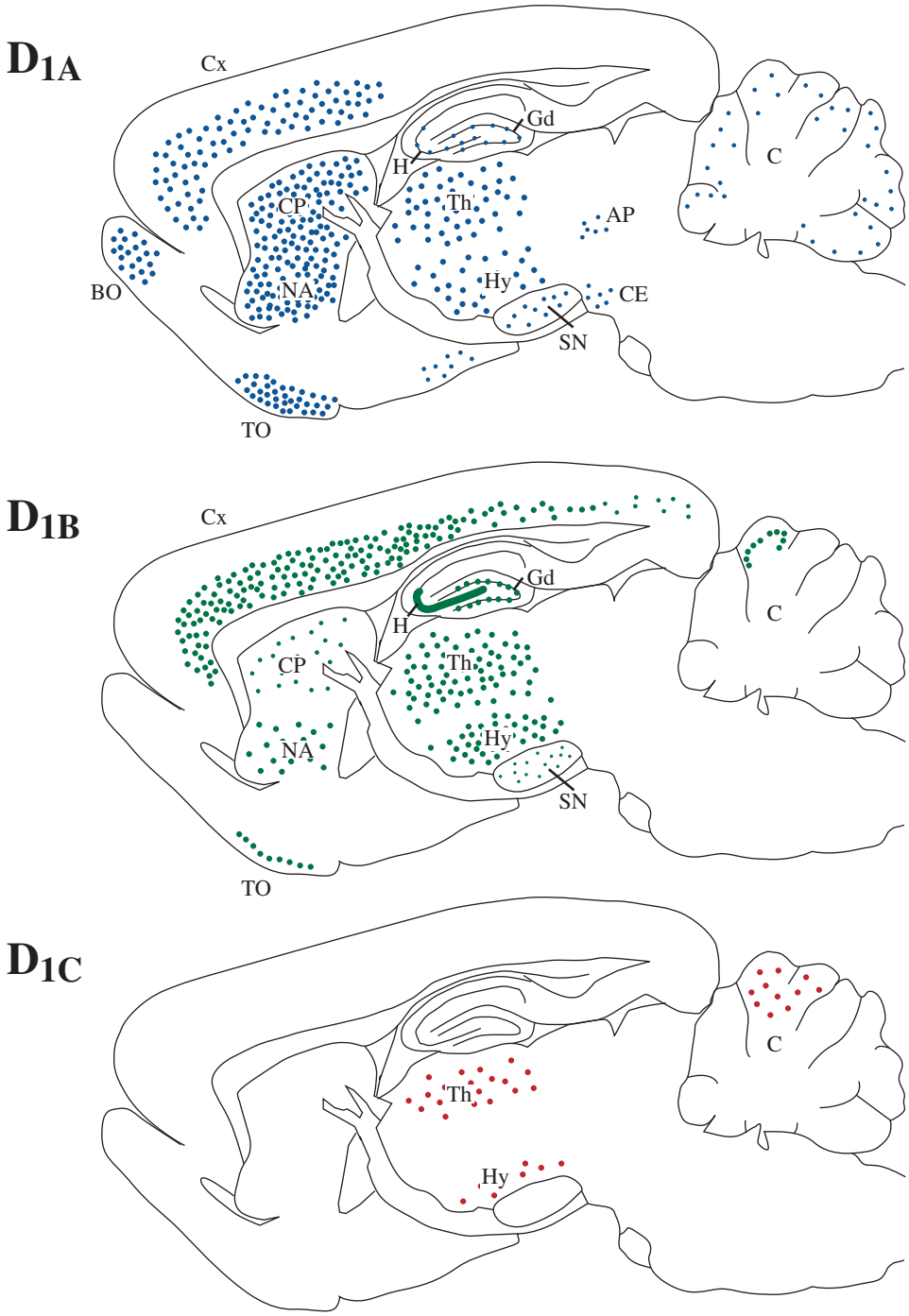


Figure 10 : Représentation schématique sagittale des localisations comparée des récepteurs D_1 dans le cerveau des vertébrés.

Ce schéma récapitule les différentes localisations observées chez les mammifères aussi bien pour les ARNm (hybridation in situ) que les protéines (anticorps ou liaison de ligands) (Ariano *et al*., 1997b; Huang *et al*., 1992; Le Moine *et al*., 1991; Mansour *et al*., 1991; Monsma *et al*., 1990; Severynse *et al*., 1995; Tiberi *et al*., 1991). Par extrapolation, les localisations observées pour les autres espèces sont indiquées sur le même schéma entre autres pour le récepteur D_{1C} (Cardinaud *et al*., 1997; Kapsimali *et al*., 2000). Abréviations : AP, aire prétectale; BO, bulbe olfactif C, cervelet; CE, cortex enthorinal; Cx, cortex; CP, caudate-putamen; Gd, gyrus dentelé; H, hippocampe; Hy, hypothalamus; NA, noyau accumbens; SN, substance noire; Th, thalamus et TO, tubercule olfactif.

c. Comparaison chez les mammifères de la localisation des transcrits des récepteurs D_1 avec les marquages immunocytochimiques correspondants

Quand des anticorps contre les récepteurs dopaminergiques ont été disponibles, un certain nombre de comparaisons complémentaires ont alors été faites entre la localisation des ARNm et cele des protéines. En général, les résultats obtenus avec les anticorps sont proches de ceux des hybridations *in situ* (Levey *et al*., 1993). Ainsi, les récepteurs D_{1A} et D_{1B} sont coexprimés au niveau des neurones pyramidaux des cortex préfrontaux, prémoteur, cingulate et entorhinal, de l'hippocampe et du gyrus dentelé (Bergson *et al*., 1995; Huang *et al*., 1992; Smiley *et al*., 1994). Cependant, les récepteurs D_{1A} sont retrouvés seuls dans la pars réticulata de la substance noire où aucun ARNm n'est détectable. Dans le noyau caudé, les récepteurs D_{1A} sont majoritairement localisés dans des neurones de taille moyenne GABAergiques (Le Moine et Gaspar, 1998), alors que les récepteurs D_{1B} sont présents seuls dans de les grands neurones cholinergiques (Bergson *et al*., 1995). A l'aide d'anticorps spécifiques des récepteurs D_{1B}, dans le cerveau de rat, on trouve également une bonne corrélation avec les analyses par hybridation *in situ* (Ariano *et al*., 1997b). Ainsi les régions des cortex pariétaux et frontaux, de l'hippocampe et du gyrus dentelé sont marqués et, dans une moindre mesure, on retrouve un marquage dans le striatum dorsal, le tubercule olfactif et le cervelet. La localisation des récepteurs D_1 chez le poulet est un des rares travaux d'immunohistochimie dans le cerveau d'un vertébré différent des mammifères (Schnabel *et al*., 1997). L'anticorps utilisé est dirigé contre le D_{1A} humain, et malgré les problèmes de spécificité que cela comporte, la localisation observée correspond à des aires cérébrales largementhomologue aux régions déjà définies chez les mammifères, ce qui rend compte de la conservation des structures marquées par ce récepteur au cours de l'évolution.

III.A.2. Localisation subcellulaire

Pour comprendre le rôle physiologique des récepteurs, l'analyse de la localisation subcellulaire est tout aussi indispensable que de connaître leur distribution régionale. La colocalisation des deux classes de récepteurs D_1 et D_2 est importante dans des régions comme le striatum, le bulbe olfactif et la substance noire. Cependant, à l'échelle cellulaire cette colocalisation n'est pas aussi claire (Le Moine et Bloch, 1995). Ainsi, dans le noyau caudé, le putamen, le noyau accumbens et le tubercule olfactif, les récepteurs D_1 et D_2 ségrégent de façons différentes respectivement dans les neurones de la substance P et ceux de l'enképhaline. En fait, seule une petite partie des neurones coexprime les deux classes de récepteurs. L'extension de ces expériences au cortex préfrontal chez le rat, aboutit aux mêmes conclusions. Les récepteurs D_1 et

D_2 sont exprimés dans des catégories différentes de neurones pyramidaux (Gaspar *et al.*, 1995), alors que la colocalisation n'est principalement observée que dans les neurones non pyramidaux (Vincent *et al.*, 1995).

Les premières analyses immunoréactives des récepteurs D_1 se sont focalisées sur le récepteur D_{1A}, premier sous-type à être cloné, et récepteur le plus abondant dans le striatum. La première expérience d'immunohistochimie des récepteurs D_{1A} dans le cerveau de rat a été obtenue avec un anticorps spécifique contre une région variable du C-terminal du récepteur (Huang *et al.*, 1992), bien qu'en western blot on ne distingue pas clairement la spécificité de cet anticorps. La localisation en microscopie électronique des récepteurs dans le striatum montre qu'ils sont situés sur les dendrites, au niveau de la tête et du corps des épines dendritiques, en dehors des synapses mais aussi en plus faibles proportions dans les synapses symétriques et asymétriques (Dumartin *et al.*, 1998). On observe également le récepteur D_{1A} sur des terminaisons axonales et un peu de marquage dans les corps cellulaires de nombreuses régions. Ces observations sont confirmées dans d'autres structures du cerveau comme la substance noire (Caillé *et al.*, 1996; Levey *et al.*, 1993; Yung *et al.*, 1995), le cortex préfrontal (Muly *et al.*, 1998; Smiley *et al.*, 1994). La quantification indique que plus de 75% du marquage D_1 dans le striatum est associé aux dendrites ou aux épines dendritiques. De même dans les afférences corticales du striatum, les récepteurs D_1 marqués, sont rarement distribués dans les terminaisons axonales et sont beaucoup plus abondants dans les arborisations dendritiques (43%) et les épines dendritiques (38%) (Hersch *et al.*, 1995). Très peu de marquage intracellulaire est observé sauf dans de rares endosomes, et la voie de synthèse (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) ne montre pas d'immunoréactivité (Caillé *et al.*, 1996). Pour le moment une seule étude (Bergson *et al.*, 1995) a comparé les localisations des différents sous-types du récepteur D_1, dans le cerveau des primates. Des expériences de double marquage à l'aide d'anticorps contre les récepteurs D_{1A} et D_{1B} ont montré, dans l'hippocampe et le cortex, que le récepteur D_{1A} semble prédominant dans les épines dendritiques alors que le récepteur D_{1B} serait plutôt localisé dans l'arborisation dendritique.

Toutes ces expériences montrent une séparation claire entre l'expression des deux classes de récepteur D_1 et D_2 à l'échelle cellulaire, avec une localisation principalement synaptique pour les récepteurs D_2 qui interviendraient dans la modulation de l'activité électrique, alors que les récepteurs D_1 sont plus largement répartis en dehors des synapses et fixeraient la dopamine libérée de façon “neuroendocrine”. Cependant, très peu d'expériences ont cherché à corréler la localisation des différents sous-types de récepteurs de la dopamine dans les neurones, avec leur fonction. Cette analyse serait importante puisqu'un ciblage cellulaire spécifique pourrait

expliquer la diversité des récepteurs, dans la mesure où les localisations régionales de chaque sous-type se recoupent largement. Toutefois, même si son étude n'est pas très développée, la localisation subcellulaire des différents sous-types du récepteur D_1, ne semble pas être un critère déterminant de la spécificité fonctionnelle. Il est donc possible que la différence entre chacun des sous-types provienne de leur capacité à permettre la transduction du signal de façon différente, plutôt que d'une localisation spécifique.

Pour décrire plus en détail les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs de la dopamine dans les cellules, j'ai choisi de suivre la voie que prennent les récepteurs depuis leur biosynthèse jusqu'à la membrane plasmique. En effet, pour être fonctionnels, les récepteurs doivent être correctement et précisément ciblés à la membrane plasmique (épines dendritiques, synapse, …). Alors seulement, le récepteur est capable d'être activé par son ligand et de moduler les voies de signalisation.

III.B. Biosynthèse et adressage intracellulaire des récepteurs D_1

La spécificité d'action des récepteurs dans la cellule dépend principalement de l'environnement moléculaire présent à l'endroit de sa localisation subcellulaire. Les récepteurs de la dopamine sont des protéines comportant plusieurs segments transmembranaires. Pour mieux comprendre comment les récepteurs peuvent être localisés dans des compartiments spécifiques, il est nécessaire de rappeler comment les protéines et en particulier les récepteurs à sept segments transmembranaires sont synthétisés et transportés jusqu'à la membrane plasmique.

III.B.1. Les voies de biosynthèse des récepteurs de la dopamine

L'insertion du récepteur dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) intervient en même temps que le processus de traduction (Figure 11, étape 1; pour revue voir Schatz et Dobberstein, 1996). Les récepteurs à sept segments transmembranaires ne possèdent pas de séquence “signal” reconnue par la protéine SRP (Signal Recognition Proteins), protéine nécessaire pour pouvoir traverser la membrane du réticulum endoplasmique. Il est supposé que les hélices α des segments transmembranaires contiennent des séquences d'ancrage et d'arrêt pour leur insertion correcte dans la membrane du réticulum (Wessels et Spiess, 1988). Des expériences réalisées avec des peptides synthétiques contenant différentes combinaisons des segments transmembranaires montrent que l'insertion des segments des récepteurs des opsines ou des phéromones dans le réticulum, s'effectue deux par deux (Audigier *et al.*, 1987; Stefan *et al.*, 1998). Dans le même temps, durant la synthèse du récepteur et sa translocation à l'intérieur de la

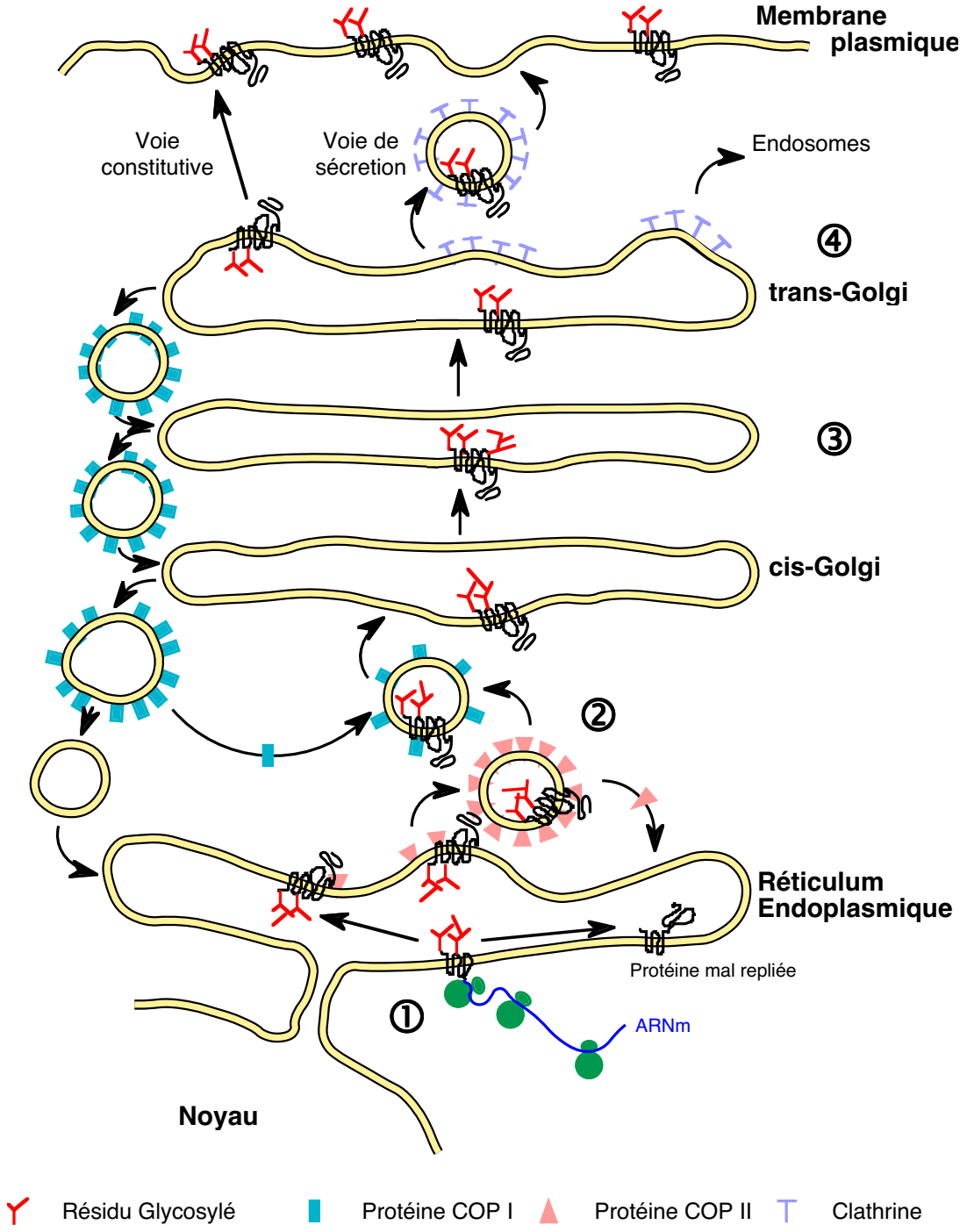


Figure 11 : Biosynthèse des récepteurs couplés aux protéines G.

Ce schéma décrit les principales étapes du transport intracellulaire des récepteurs à sept segments transmembranaires. Après la traduction des ARNm, le récepteur s'insère dans la membrane du réticulum endoplasmique (1). Les premières glycosylations sont utilisées comme un moyen de vérifier le repliement des protéines. Les récepteurs correctement insérés sont exportés dans des vésicules recouvertes par COP II (2). En se dirigeant vers le *cis*-Golgi, ces vésicules échangent les protéines COP II contre COP I. D'autres maturations, telles que des glycosylations interviennent dans l'appareil de Golgi (3). A la sortie du *trans*-Golgi, trois voies d'exportation sont possibles (4). Les vésicules recouvertes de clathrine sont utilisées dans la voie de sécrétion ainsi que par les enzymes de recyclage, alors que l'exocytose constitutive n'utilise pas de vésicules recouvertes.

membrane du réticulum, un phénomène de glycosylation a lieu (Fiedler et Simons, 1995). Cette glycosylation correspond à l'ajout d'oligosaccharides sur une asparagine extracellulaire (Asn-X-Ser/Thr). Cette étape est impliquée dans le contrôle de la qualité du repliement des protéines. En utilisant la tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation, on démontre que sans l'ajout de N-glycane, les protéines ne peuvent sortir du réticulum. La glycosylation correcte est donc nécessaire pour le tri des protéines membranaires avant qu'elles ne passent du réticulum vers le compartiment *cis*-Golgien (Figure 11, étape 2). Les récepteurs incorrectement repliés ou mal glycosylés sont reconnus par le système de “contrôle qualité” et dirigés de façon rétrograde vers les compartiments de dégradation. La localisation à la membrane de plusieurs récepteurs comme les récepteurs du calcium, de la lutropine ou le transporteur épinéphrine, est dépendante de la N-glycosylation.

Dans le cas des récepteurs D_2, le blocage de la glycosylation par la tunicamycine inhibe le transport du récepteur dans la voie de sécrétion (résultats obtenus au laboratoire par Delphine PROU). Le traitement des cellules HEK 293 par la tunicamycine empêche aussi la localisation membranaire du récepteur D_{1B} humain mais curieusement pas celle du D_{1A} (Karpa *et al.*, 1999). La mutation des trois sites potentiels de N-glycosylation du récepteur D_{1B} (Asn 7, Asn 198 et Asn 222) montre que seuls les deux premiers sites sont véritablement glycosylés. Le site Asn 7 semble être celui qui joue un rôle pour que la localisation des récepteurs soit correcte alors que la mutation de ce site n'affecte pas les capacités de fixation des ligands. Ces expériences démontrent qu'un ensemble plus complexe de signaux que la seule glycosylation doit intervenir pour diriger le récepteur vers la membrane plasmique.

Une fois que la protéine a traversé la membrane du réticulum, sa mise en conformation correcte requiert l'intervention de protéines “chaperonnes” de la famille des HSP (Heat Shock Protein). L'intervention de ces protéines de repliement a été montrée pour les opsines de drosophiles (Carbajal *et al.*, 1990) mais aucune preuve n'indique que tous les récepteurs couplés aux protéines G se comportent de cette manière. En fait, pour de nombreuses protéines membranaires, un signal positif semble nécessaire pour l'interaction avec des protéines qui permettent le transport des protéines membranaires le long de la voie de sécrétion. De telles séquences ont été identifiées d'abord pour la glycoprotéine du virus du stomate vésiculaire (VSV-G, Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein). Elles permettent l'interaction entre les récepteurs et les protéines de transport pour former des vésicules du réticulum vers le *cis*-Golgi. Ces protéines de transport appartiennent à la famille des COP (Coatomer Proteins; pour revue voir Hong, 1998; Schekman et Orci, 1996). Toutefois, les interactions entre les récepteurs et les protéines du complexe COPII pourraient se faire par l'intermédiaire d'adaptateurs (pour revue voir Bannykh *et al.*, 1998). Lorsque les vésicules COPII sont formées, un échange se produit entre les protéines COPII et COPI permettant le recyclage rétrograde de la machinerie

enzymatique du réticulum alors que les protéines “cargo” continuent dans la voie antérograde vers le *cis*-Golgi (Figure 11, étape 2).

Données en faveur de la maturation cisternale

- L'appareil de Golgi de certaines algues peut transporter des écailles trop larges pour un transport vésiculaire.
- Des mutations dans les sous-unités des coatomères chez la levure affecte le transport rétrograde et pas antérograde.
- Il y a trop peu de SNAREs dans le génome de la levure pour rendre compte des étapes multiples du transport antérograde à travers l'appareil de Golgi.

Données en faveur d'un transport vésiculaire antérograde

- L'appareil de Golgi a une structure définie, comprenant un nombre fixe de citernes liées au réseau *cis*- et *trans*-Golgien.
- Les enzymes du Golgi ont des localisations fixes et précises.
- Certains des récepteurs des “COP” possèdent des signaux de transport antérogrades et rétrogrades.
- On peut distinguer deux populations de vésicules COPI contenant des protéines antérogrades (pro-insuline) ou rétrogrades (récepteur KDEL) mais pas les deux.

Tableau 3 : Le transport dans l'appareil de Golgi : maturation cisternale ou transport vésiculaire antérograde (d'après Warren et Malhotra, 1998).

Deux mécanismes distincts peuvent rendre compte du transport des protéines dans l'appareil de Golgi (pour revue voir Warren et Malhotra, 1998, et Tableau 3). La première théorie implique le transport antérograde des récepteurs grâce au trafic des vésicules depuis le *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi avec un recyclage rétrograde pour les vésicules COPI. La seconde théorie est fondée sur la maturation des citernes golgiennes, où les protéines membranaires ne quittent jamais les empilements de saccules (pour revue voir Füllekrug et Nilsson, 1998; Lowe et Kreis, 1998). Dans ce modèle également, un mécanisme de transport antérograde impliquant les vésicules COPI est nécessaire pour recycler les enzymes de maturation (Figure 11, étape 3). De récentes observations en microscopie électronique de la sécrétion du procollagène montre que cette protéine n'est jamais observée dans des vésicules tout au long de l'appareil de Golgi (Bonfanti *et al.*, 1998), ce qui favorise plutôt la deuxième hypothèse. Durant le séjour dans l'appareil de Golgi, d'autres étapes importantes de la maturation des protéines ont lieu, dont les principales sont des glycosylations. Mais, si le rôle de la glycosylation dans le ciblage des enzymes des voies de dégradation vers les compartiments où ils agissent a bien été démontré, il n'est pas certain qu'elles participent au tri des protéines membranaires qui est indispensable pour que les protéines soient correctement localisées dans la cellule. Ce tri intervient dans le réseau *trans*-Golgi (TGN, Trans-Golgi Network) selon trois mécanismes différents (Keller et Simons, 1997; Le Borgne et Holflack, 1998; Figure 11, étape 4).

- La première voie utilise les vésicules recouvertes de clathrine pour diriger les protéines directement vers les endosomes précoces ou tardifs (pour revue voir Schmid,

1997). Cette voie est utilisée par les enzymes de dégradation des protéines et nécessite des glycosylations.

- La deuxième voie emprunte aussi les vésicules à clathrine qui vont fusionner avec la membrane plasmique et correspond à ce que l'on appelle la voie d'exocytose régulée.
- Enfin la dernière voie correspond à l'exocytose constitutive qui ne semble pas utiliser de vésicules recouvertes d'un manteau particulier, mais qui pourrait nécessiter l'existence de séquences ou de résidus glycosylés spécifiques des protéines transportées par cette voie.

Bien que ces deux dernières voies transportent la majorité des protéines membranaires à la membrane plasmique, la voie exacte empruntée par les récepteurs à sept segments transmembranaires n'est pas connue. Quelque soit le mécanisme de transport employé, la localisation finale du récepteur est le déterminant de la spécificité de réponse du récepteur.

III.B.2. La localisation spécifique des récepteurs dans les cellules polarisées

Si la question du tri cellulaire a été abordée dans tellement de travaux c'est qu'il est responsable pour une très grande partie de la mise en place ou du maintien de la polarisation cellulaire. Dans le cas des neurones, cellules polarisées par excellence, comprendre comment une protéine est plus particulièrement envoyée vers l'extrémité axonale ou dans l'arborisation dendritique est fondamental. Ces mécanismes pourraient être à l'origine de la localisation subcellulaire différentielle de chacun des sous-types du récepteur D_1. L'analyse de la localisation polarisée des protéines dans les neurones et les cellules épithéliales a été menée à l'aide de protéines de virus comme le SFV (Semliki Forest Virus), le VSV (Vesicular Stomatitis Virus) ou le FPV (Fowl Plague Virus) (Dotti et Simons, 1990). On retrouve ainsi l'hémagglutinine (HA) du FPV dans l'axone des neurones de l'hippocampe et dans le domaine apical des cellules épithéliales polarisées. Par contre on observe que la protéine E2 (SFV) et la protéine VSV-G (VSV) sont adressées aux dendrites et au domaine basolatéral pour les mêmes types cellulaires, respectivement (pour revue voir Bradke et Dotti, 1998). Pour d'autres protéines neuronales, il existe des phénomènes de ciblage identiques (Dotti *et al.*, 1991). Le récepteur $GABA_B$ par exemple est transporté à l'extrémité apicale dans les cellules épithéliales MDCK (Marti-Darby Canine Kidney) et dans l'axone des neurones de l'hippocampe en culture. Par contre, une localisation somato-dendritique et basolatérale est observée pour le récepteur de la transferrine, le récepteur des LDL (transporteur du cholestérol), la sous-unité α du récepteur $GABA_A$ et le récepteur pIg (human epithelial polymeric immunoglobulin receptor). Cependant, ce modèle qui assimile domaine basolatéral des cellules épithéliales et dendrites des neurones, n'est pas

universel. Par exemple, la sous-unité ß du récepteur $GABA_A$ est localisée dans la région somato-dendritique des neurones de l'hippocampe alors qu'elle se trouve au pôle apical des cellules MDCK. De même la protéine APP (Amiloid Precursor Protein) est axonale alors qu'on la retrouve dans le domaine basolatéral des cellules MDCK.

En général, les récepteurs membranaires sont synthétisés avant la formation des synapses et dans le cas des récepteurs du glutamate (GluR1) et de la glycine (GlyR), il existe une réserve de récepteurs intradendritiques juste avant qu'ils ne soient adressés à la membrane. Comment dans ce cas se fait l'insertion dans la membrane plasmique ? L'orientation des éléments du cytosquelette est un phénomène important dans les neurones. Les microtubules associées aux neurites forment un réseau dans le corps cellulaire. On ne trouve l'appareil de Golgi que dans les corps cellulaires et jamais dans les axones. Tous ces éléments font que deux théories s'affrontent pour la mise en place de la polarisation dans les neurones (Ikonen et Simons, 1998) :

- Soit le tri dans l'appareil de Golgi entraîne la polarisation des neurones.
- Soit le flux membranaire “polarise” le neurone et oriente ensuite le tri cellulaire.

Il semble qu'en fait, un phénomène en deux étapes soit possible. D'abord la maturation morphologique indépendante du tri moléculaire permet d'offrir une première polarisation morphologique au neurone, ensuite le tri dans l'appareil de Golgi et l'ancrage différentiel des protéines créent alors une polarisation fonctionnelle.

La formation de compartiments spécifiques de la morphologie neuronale est certainement due à la mise en place des différents éléments du cytosquelette (pour revue voir Aroeti *et al.*, 1998). Parmi ces éléments, la famille des GTPase Rho est connue pour son implication dans les phénomènes de modification de la morphologie des cellules et en particulier dans celui des neurones lors, par exemple, du guidage du cône de croissance (pour revue voir Hall, 1998; Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997). La protéine Rac qui appartient aussi à cette famille intervient dans la formation de compartiments spécialisés du neurone. En effet, des expériences d'expression ciblée, dans les cellules de Purkinje de cerveau de souris, d'une forme activée de la protéine Rac, montre une réduction dans la taille du prolongement axonal et de l'arbre dendritique (Luo *et al.*, 1996). Mais surtout, le nombre d'épines dendritiques et de doubles synapses augmente de façon importante par rapport à la situation sauvage. En conséquence, il semble que ces protéines de régulation du cytosquelette soient capables d'intervenir dans la mise en place de la structure spécialisée et de la compartimentation des neurones. Cette famille de protéines semble d'ailleurs aussi jouer un rôle important dans la mise en place de la polarité des cellules épithéliales (Yeaman *et al.*, 1999). L'expression d'un mutant inactif de la protéine Rac permet aux cellules MDCK de rester compactes alors que l'injection de la forme active fait apparaître un phénotype fibroblastique (Jou et Nelson, 1998).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de séquence consensus de ciblage à la membrane plasmique pour les récepteurs couplés aux protéines G. Différentes analyses de localisation ont été menées pour ce type de récepteur (Tableau 4), et il ne semble pas possible de pouvoir corréler des localisations spécifiques avec certains motifs de la séquence des récepteurs. De plus, certains récepteurs sont localisés dans les deux compartiments, apical et basolatéral, mais dans des proportions différentes. Ainsi le récepteur α_{2A}-adrénergique est présent en quantité neuf fois plus importante dans la région basolatérale que dans la région apicale, le récepteur TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) quatre fois et le récepteur de la calcitonine humaine quarante fois. Si la régulation de la localisation intracellulaire semble si complexe, il est possible que le ciblage subcellulaire différentiel soit une des justifications de la diversité des récepteurs de la dopamine, comme de celle d'un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G.

Cellules du tubule proximal du néphron :	
Apical et basolatéral	Récepteurs du PTH, de l'angiotensine II, du VIP et de la dopamine
Basolatéral	Récepteurs α_2-adrénergiques
Cellules de l'endothélium vasculaire	
Apical	Récepteur LH
Cellules épithéliales MDCK	
Apical	Récepteurs A de la bradykinine et A_1 de l'adénosine
Basolatéral	Récepteurs sérotonine 5-HT_{1C}, $\alpha_{2A/B/C}$-adrénergiques et ceux de la TRH, FSH, LH et thyréotropine

Tableau 4 : Exemples de localisations polarisées des récepteurs à sept segments transmembranaires.

Dans ce tableau sont recensés plusieurs exemples de localisation différentielle de récepteurs couplés aux protéines G dans des cellules de type épithélial. PTH : Parathormone, VIP : Vasoactive Intestinal Peptide, LH : Luteinizing Hormone, TRH : Thyrotropin Releasing Hormone et FSH : Follicule Stimulating Hormone.

III.B.3. L'adressage fonctionnel différentiel des protéines

Historiquement, les premières analyses de localisations différentielles entre sous-types de protéines appartenant à une même famille, ont porté sur les isoformes de la myosine et de l'actine dans la cellule musculaire. L'actine et la myosine sont globalement localisées dans les éléments contractiles des cellules musculaires, mais les isoformes non spécifiques des muscles se trouvent dans des structures du cytosquelette différentes de ces éléments (Gunning *et al.*, 1998). De plus, il existe une différence de tri de ces isoformes au cours du développement dans les neurones. Ainsi, la ß-actine est fortement localisée dans le cône de croissance à l'état embryonnaire alors qu'elle se redistribue uniquement dans les dendrites et le corps cellulaire à l'état adulte. Ajouté à ces phénomènes constitutifs de localisation subcellulaire différentielle, on trouve aussi des modifications en fonction des mécanismes de signalisation. En effet, les phénomènes de

relocalisation sont courants pour les protéines impliquées dans la transduction du signal. Par exemple, une dizaine d'isoformes de la PKC sont impliquées dans une large variété de réponses cellulaires et répartie à quelques exceptions près dans tout le cytoplasme des cellules NIH 3T3 (Goodnight *et al.*, 1995). Après activation par les esters de phorbol, la plupart de ces isoformes se localise à la membrane plasmique avec en plus certaines localisations spécifiques comme le réticulum endoplasmique (α), les lamellipodes (ßI, ßII), les points d'adhésion (α), les fibres de stress (ßII), les zones de contact cellulaire (δ, ε), la membrane périnucléaire (δ, ε), les pores nucléaires (η) et l'appareil de Golgi (γ, η).

Des études similaires ont été entreprises pour essayer de corréler l'abondance de sous-types de récepteurs couplés aux protéines G et leurs localisations subcellulaires. Ce sont pour les sous-types de récepteurs α-adrénergiques que les travaux les plus importants ont été entrepris. Les informations à propos des déterminants moléculaires de la localisation des récepteurs sont obtenues à partir d'expériences de transfection dans des cellules hétérologues (Figure 12). Pour les récepteurs adrénergiques et de l'adénosine de telles études ont été conduites sur des cultures de cellules polarisées (pour revue voir Wozniak *et al.*, 1997). Les expériences effectuées sur les cellules MDCK ont montré que les sous-types α_{2A} et α_{2C} des récepteurs adrénergiques sont directement délivrés au domaine basolatéral. Mais, si le récepteur α_{2A} est maintenu dans ce domaine, à l'état d'équilibre, le récepteur α_{2C} reste intracellulaire, localisé dans le réseau *trans*-Golgien. Ces phénomènes de localisation sont visiblement indépendants de l'interaction avec les protéines G (Keefer et Limbird, 1993). Le sous-type α_{2B} est réparti entre le domaine apical et basolatéral, mais il est sélectivement ancré dans la région basolatérale (Wozniak et Limbird, 1996). Le récepteur A_1 de l'adénosine (A_1AdoR) a été analysé de la même façon (Saunders *et al.*, 1996), et il présente des mécanismes de localisation différents puisqu'il est ciblé de façon prédominante au domaine apical (Saunders et Limbird, 1997). Il semble vraisemblable que la rétention des récepteurs dans un compartiment donné dépend de la présence, dans ce compartiment, de protéines qui permettent au récepteur, transporté de façon relativement non spécifique, de rester localisé à un site précis de la cellule. En plus des associations avec ces protéines d'ancrage, les récepteurs sont capables de s'associer entre eux (dimérisation) pour permettre leur localisation fonctionnelle correcte. Pour les récepteurs GABA par exemple, un des variants d'épissage du récepteur $GABA_B$, le récepteur $GABA_{BR1a}$, ne se localise pas à la membrane des cellules, mais reste dans le réticulum endoplasmique (Couve *et al.*, 1998) en absence de la coexpression du sous-type $GABA_{BR2}$. Cette localisation intracellulaire se retrouve aussi bien dans des cellules non-neuronales (COS, HEK 293, BHK) que neuronales (ganglion de la racine dorsale). De la même façon, le récepteur 5-HT_{1B} qui est situé dans les extrémités axonales se retrouve dans l'appareil de Golgi lorsqu'il est exprimé dans les cellules LLC-PK1

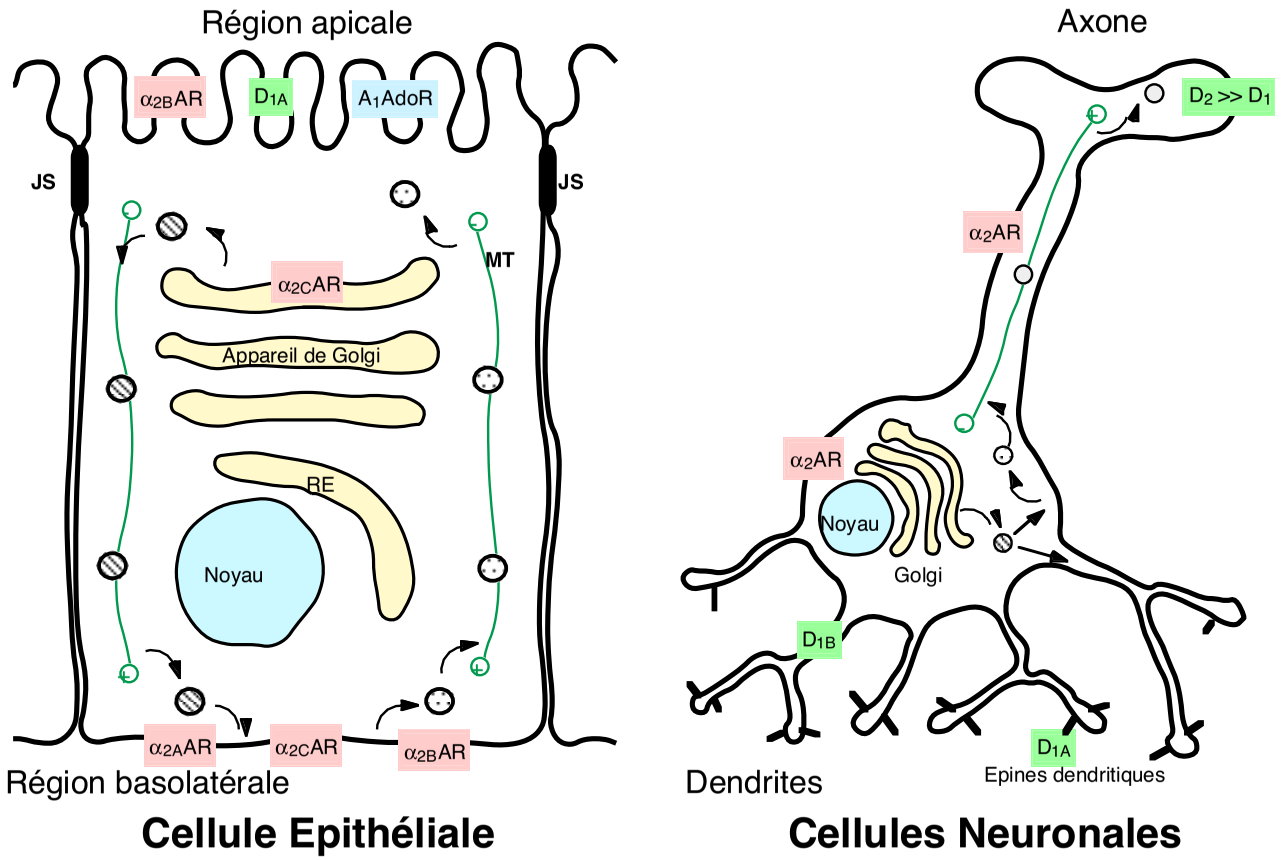


Figure 12 : Polarité cellulaire et localisation des récepteurs couplés aux protéines G.

La localisation des récepteurs à sept segments transmembranaires est représentée dans les deux modèles classiques de polarisation cellulaire. Les cellules épithéliales ont été utilisées pour les récepteurs aux bioamines. Ainsi les trois sous-types de récepteur α-adrénergiques sont localisés dans le domaine basolatéral (α_{2A}AR, α_{2B}AR et α_{2C}AR). Mais, si les récepteurs α_{2A} et α_{2C} y sont retenus spécifiquement, le récepteur α_{2B} comme le récepteur A_1 de l'adénosine (A_1AdoR) rejoint la membrane apicale le long des microtubules (MT). Ces deux sous-domaines membranaires sont séparés physiquement par des jonctions serrées (JS). De plus, une forte proportion de récepteur α_{2C} reste intracellulaire à l'état d'équilibre. La comparaison des localisations avec les neurones n'a pas été très informative, puisque tous les récepteurs α_2 se retrouvent dans tout l'axone et le corps cellulaire. Sur ce schéma, sont aussi indiquées les localisations subcellulaires observées pour les récepteurs de la dopamine.

(Langlois *et al.*, 1996). L'absence d'un partenaire neuronal empêche visiblement sa localisation finale correcte. Dans le cas du modèle classique des cellules épithéliales, il semble donc que les récepteurs couplés aux protéines G utilisent de multiples mécanismes pour leur ciblage polarisé.

Des transfections transitoires de culture primaire de neurones de moelle épinière embryonnaire de souris avec les différents sous-types de récepteurs α-adrénergiques ne montrent pas de localisation spécifique pour chaque sous-type. Chaque récepteur est réparti à travers tout le corps cellulaire et ses prolongements (Wozniak et Limbird, 1998). Ces expériences démontrent les difficultés de faire des corrélations entre la localisation dans les cellules polarisées *in vitro* et les neurones *in vivo*. Toutefois, l'analyse en microscopie confocale des récepteurs α_1-adrénergiques montre qu'après activation, des regroupements de récepteurs à la membrane plasmique s'effectuent dans le corps cellulaire et les prolongements de neurones en cultures (Wang *et al.*, 1997b). Ces résultats sont en accord avec les précédentes observations de la localisation de ces récepteurs dans des cultures de neurones corticaux en croissance, et démontrent la nécessité de mettre au point des outils plus adéquats pour étudier la localisation subcellulaire des récepteurs.

III.B.4. Dimérisation et adressage fonctionnel des récepteurs D_1

Jusqu'à une date récente, il semblait certain que les récepteurs couplés aux protéines G possédaient une structure qui leur permettait de réaliser à elle seule l'ensemble du processus de transduction du signal. Il semble maintenant que la dimérisation des récepteurs pourrait être nécessaire dans certains cas au moins, pour rendre fonctionnel le récepteur délivré à la membrane. Pour les récepteurs à activité tyrosine kinase, à un seul segment transmembranaire, la dimérisation est un processus bien connu nécessaire à la transduction du signal (pour revue voir Pawson et Scott, 1997). Par contre, les processus d'oligomérisation des récepteurs à sept segments transmembranaires sont beaucoup moins clairs (Hébert et Bouvier, 1998). L'existence de multimères de récepteurs a d'abord été suggérée à partir des observations par western blot où la formation de bandes multiples lors de la migration des récepteurs pouvait indiquer la présence de formes multimériques. Ces bandes sont généralement visibles après immunoprécipitation ou biotinylation de la membrane (Romano *et al.*, 1996). De telles expériences effectuées dans des membranes de neurones issus du cerveau aussi bien que dans des cellules transfectées montre la formation des dimères et tétramères pour le récepteur D_3 (Nimchinsky *et al.*, 1997), D_2 (Ng *et al.*, 1996) et D_{1A} (Ng *et al.*, 1994).

Ces classiques expériences d'immunoprécipitation, après coexpression de récepteurs dans des cellules, en général hétérologues, ne permettaient pas d'avoir une idée précise du phénomène, à cause de la tendance à l'agrégation des récepteurs couplés aux protéines G dont les parties

transmembranaires sont fortement hydrophobes. Un ensemble de données publiées ces deux dernières années donnent un nouvel essor à l'hypothèse de la dimérisation des récepteurs. Plusieurs aspects différents de la fonction des récepteurs pourraient impliquer la dimérisation (Figure 13).

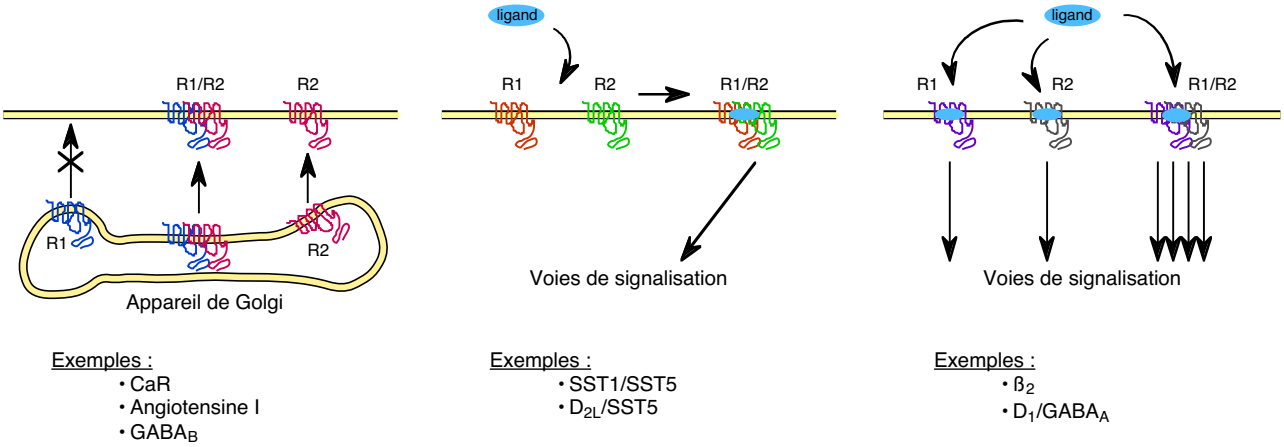


Figure 13 : Les différentes fonctions de la dimérisation.

Ce schéma récapitule les différentes conséquences de la dimérisation des récepteurs. **A.** La dimérisation est nécessaire pour l'expression fonctionnelle du récepteur. Le récepteur R1 n'est pas capable d'être localisé seul à la membrane mais uniquement lors de la coexpression avec le récepteur R2. **B.** La fixation du ligand permet la dimèrisation des récepteurs nécessaire à la transduction du signal. **C.** La transduction du signal est possible pour chaque récepteur sous sa forme monomérique, mais la dimérisation permet de modifier l'efficacité de transduction ou de permettre le couplage à d'autres voies de signalisation.

a. La dimérisation est nécessaire à la localisation correcte du récepteur dans la cellule

Historiquement, la formation d'homodimères et d'hétérodimères entre les récepteurs adrénergiques et muscariniques a été mise en évidence grâce à la fabrication de protéines chimères entre les récepteurs α_2-adrénergiques et m_3 muscariniques (échange du C-terminal et des 6ème et 7ème segments transmembranaires). En effet, ces chimères ne permettent de restaurer la liaison des ligands de façon correcte que lors de la cotransfection des chimères réciproques (Maggio *et al.*, 1993). Des expériences plus physiologiques ont été menées pour le récepteur de l'angiotensine II. La co-expression, de deux récepteurs mutés et non fonctionnels, restaure des valeurs de liaison normale (Monnot *et al.*, 1996). Les mutations lysine 102 (3ème segment transmembranaire) et lysine 199 (5ème segment transmembranaire) entraînent chacune l'absence de la liaison d'agonistes spécifiques et l'impossibilité d'induire la transduction du signal. Par contre, la coexpression de ces deux mutants conjointement dans les cellules COS et CHO (Chinese Hamster Ovary) permet de retrouver une partie de la liaison spécifique mais pas le

couplage complet aux voies de signalisation intracellulaire, puisque seule l'hydrolyse des phosphatidylinositol après activation du récepteur est restaurée. Ces expériences indiquent qu'à l'état naturel, les récepteurs de l'angiotensine II sont capables de former des hétéromères fonctionnels.

C'est pour la 3ème famille de récepteurs couplés aux protéines G que les démonstrations fonctionnelles de la dimérisation sont les plus claires. Récemment, l'expression de différents sous-types de récepteurs $GABA_B$ dans des cellules montre qu'ils ne sont pleinement fonctionnels que grâce à la formation de complexes hétéromériques (Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Le couplage aux canaux potassium n'est jamais observé par transfection seul d'un des sous-types de récepteur $GABA_B$: R1A, R1B ou R2. Par contre, l'expression conjointe de deux de ces trois types permet ce couplage et provoque en plus une augmentation de l'affinité de liaison des agonistes et antagonistes. Ces hétéromères sont observés par coimmunoprécipitation et colocalisation dans des épines dendritiques (Kaupmann *et al.*, 1998). Par transfection dans des cellules, le récepteur $GABA_{BR1}$ reste sous forme de glycoprotéine immature sur des membranes intracellulaires. Lorsqu'il est exprimé avec des récepteurs $GABA_{BR2}$ le récepteur $GABA_{BR1}$ retrouve une localisation membranaire correcte, une glycosylation complète et l'accessibilité des ligands (White *et al.*, 1998). Ces observations révèlent que pour être totalement fonctionnels, les récepteurs ont besoins d'être associés à la membrane plasmique sous forme d'homo ou d'hétérodimères.

b. La dimérisation nécessite l'activation d'un ou des récepteurs

L'interaction directe entre le récepteur D_{2L} et le récepteur SST5 de la somatostatine a été montrée cette année (Rocheville *et al.*, 2000a). L'hétérodimérisation a été observée par la technologie FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert), révélant la proximité des deux récepteurs. La transmission d'énergie n'existe qu'en présence de l'un des deux ligands, sans effet synergique. En absence de ligand, aucun rapprochement de deux récepteurs n'est observé. La dimérisation a pour conséquence une augmentation de l'affinité de la liaison des ligands ainsi que de l'efficacité de couplage à l'adénylate cyclase. En utilisant cette méthode de FRET, la même équipe a observé ces phénomènes d'homo et hétérodimérisation à l'intérieur de la famille des récepteurs à la somatostatine (Rocheville *et al.*, 2000b). Les récepteurs SST1 et SST5 sont capables d'interagir sous forme d'homo ou d'hétérodimère alors que cela n'est pas possible pour le récepteur SST4. L'interaction ne se produit toujours qu'après la fixation du ligand. Une fois le récepteur activé, la dimérisation peut aussi être un moyen de réguler l'activité des récepteurs, comme c'est le cas pour les récepteurs δ des opiacés (Cvejic et Devi, 1997) où les agonistes capables ou non d'induire l'internalisation du récepteur modifient aussi la capacité du récepteur à

se dimèriser. Ainsi les agonistes qui permettent la disparition des dimères au profit des monomères facilitent aussi l'internalisation. Les implications thérapeutiques de ces phénomènes sont sans doute très importantes, bien qu'encore hypothétiques.

c. La dimérisation module l'efficacité de la transduction et l'activation des protéines G

Nous venons de citer quelques exemples où la dimérisation est nécessaire à l'activation des récepteurs, mais les récepteurs peuvent aussi être déjà présents à la surface de la cellule dans leur état dimérisé. Des expériences qui plaident en ce sens ont été effectuées avec des peptides compétiteurs dirigés contre certains segments transmembranaires des récepteurs. Cette technique a été utilisée avec succès avec les récepteurs $ß_2$-adrénergiques, où un peptide similaire au 6ème segment transmembranaire inhibe la dimérisation et l'activation de l'adénylate cyclase (Hébert *et al.*, 1996). En utilisant un peptide dirigé contre le même segment du récepteur D_1, on entraîne une diminution de l'affinité et d'efficacité dans la production d'AMPc, sans empêcher la formation d'oligomère, contrairement aux récepteurs $ß_2$-adrénergiques (George *et al.*, 1998). Par contre, un peptide correspondant au 7ème segment transmembranaire des récepteurs D_2 bloque la formation de dimères (Ng *et al.*, 1996). Ces interactions situées dans les 6ème et 7ème segments transmembranaires et qui permettent la dimérisation, sont donc spécifiques de chaque classe de récepteur. La fixation de l'agoniste favorise l'état dimérique alors qu'un agoniste inverse plutôt l'état monomérique. Hébert et *al.* ont effectué le sauvetage d'une mutation constitutive activatrice du récepteur $ß_2$-adrénergique (Cys 341 Gly) par coexpression de la forme sauvage (Hébert *et al.*, 1998). L'effet dominant négatif est alors annulé par la dimérisation des récepteurs. Dans tous les cas, il n'y a pas de motif de dimérisation commun observé pour les récepteurs couplés aux protéines G. La base structurale des dimérisations entre récepteurs homologues semble fondée sur l'échange des domaines transmembranaires des récepteurs (Gouldson *et al.*, 1998). Dans cette configuration, les récepteurs seraient surtout en contact au travers des 5ème et 6ème hélices α transmembranaires pour former des poches de fixation des ligands facilitant ainsi la transduction du signal. Ces interactions peuvent être interprétées comme un effet de la formation du transducisome (pour revue voir Bockaert et Pin, 1999; Hébert et Bouvier, 1998). Ainsi, la dopamine est capable d'entraîner la désensibilisation des récepteurs du glutamate (Schmidt *et al.*, 1994). Toutefois, cette interaction peut ne provenir que de la phosphorylation hétérologue du récepteur lors de la désensibilisation et non de l'existence d'une interaction hétéromérique entre ces récepteurs.

d. La dimérisation permet les interactions avec d'autres classes de récepteurs

L'existence d'interactions croisées entre le récepteur D_{1B} et le récepteur $GABA_A$ de rat a été montré très récemment (Liu *et al*., 2000). Cette interaction spécifique ne fait intervenir que le récepteur D_{1B} et pas le sous-type D_{1A} grâce à une association physique des régions C-terminales du récepteur D_{1B} et de la sous-unité γ_2 du récepteur $GABA_A$. Cette interaction entraîne également des modifications fonctionnelles puisque l'addition de GABA entraîne une diminution de l'activation maximale d'AMPc due au récepteur D_{1B}. De même, l'ajout de dopamine dans des neurones d'hippocampe en culture module la réponse électrophysiologique des récepteurs $GABA_A$. Ces données montrent que l'interaction entre les récepteurs semble plus complexe qu'une simple dimérisation pour la modulation des voies de signalisation et que la forte divergence que l'on trouve entre les sous-types du récepteurs D_1 dans la région C-terminale pourrait être responsable de la spécificité des récepteurs dans des interactions avec différents types de récepteurs.

Si pourtant la réalité fonctionnelle de la formation des complexes oligomériques et hétéromériques est clairement montrée, il faudrait encore d'autres expériences pour comprendre où, dans la cascade de signalisation la dimérisation intervient. En effet, presque chaque étape de la biologie du récepteur dans la cellule peut-être affectée, qu'il s'agisse de l'activation, de l'internalisation ou de la désensibilisation.

IV. Transduction et modulation du signal intracellulaire par les récepteurs D_1

Lorsque le récepteur est correctement ciblé à la membrane plasmique, il est prêt pour être activé par le neurotransmetteur. Cependant les très nombreuses voies de transduction du signal qui existent et qui peuvent être théoriquement activées impliquent l'existence d'un ordre d'organisation supplémentaire à la membrane plasmique. En effet, le choix entre les différentes voies peut avoir lieu à plusieurs niveaux tels que celui des protéines G, celui des interactions directes entre récepteurs, ou celui de l'organisation de complexes supramoléculaires contenant les protéines effectrices.

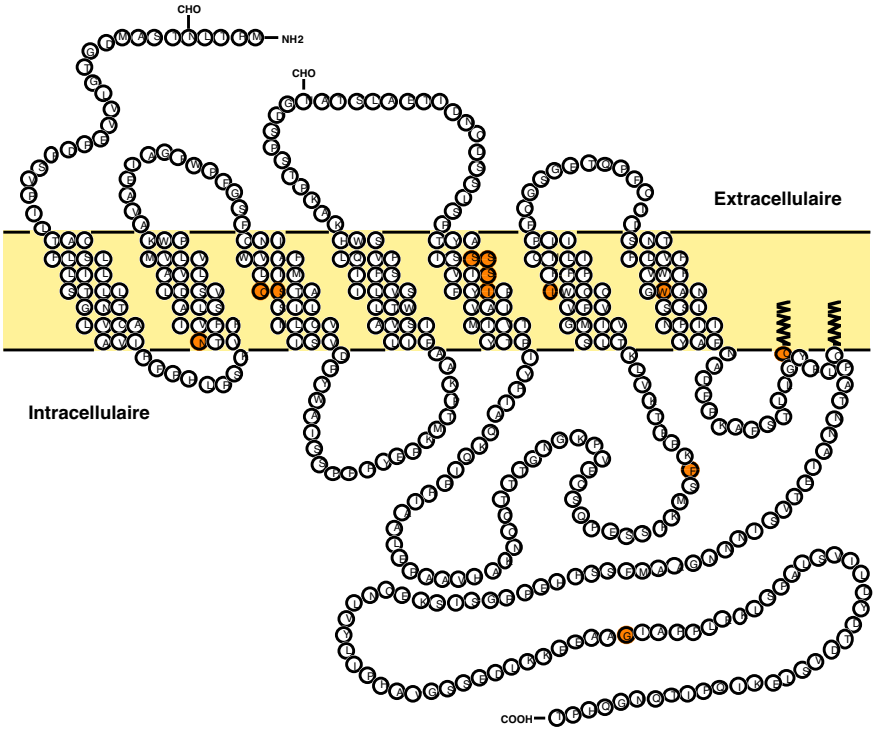
IV.A. Couplage des récepteurs aux protéines G et contraintes structurales

Le rôle des récepteurs couplés aux protéines G doit d'abord être considéré comme facteur d'échange pour l'activation des protéines G (pour revue voir Hamm, 1998; Valdenaire et Vernier, 1997). Cependant, ce facteur d'échange dépend de signaux extracellulaires. En pratique, le récepteur oscille entre deux états fonctionnels (pour revue voir Sandhya et Vemuri, 1997). Au repos, la protéine G est associée aux régions cytoplasmiques du récepteur dans sa forme trimérique (sous-unités α, ß et γ), liée au GDP. Dans cet état, le récepteur possède une haute affinité pour les agonistes naturels et il est stabilisé par les antagonistes. Dans son état "actif", et en présence d'agoniste, le récepteur entraîne l'échange GDP/GTP et la dissociation de la forme trimérique de la protéine G (pour revue voir Gether et Kobilka, 1998). Le récepteur passe alors dans un état de basse affinité. Les protéines G servent comme intermédiaire entre le récepteur et les voies de signalisation. Leur rôle de partenaire et leur spécificité est donc importante dans le choix du signal d'activation (pour revue voir Bourne, 1997). Les deux grandes classes de récepteurs D_1 et D_2 sont d'ailleurs couplées à des protéines G différentes, G_s pour la classe D_1 et G_i ou G_o pour la classe D_2. Plus en détail, si les récepteurs D_{1B} sont couplés à la protéine G_s comme les récepteurs D_{1A}, ils sont également couplés aux protéines G_z (Sidhu *et al.*, 1998). En marge de ces couplages classiques, les récepteurs D_1 ont été trouvés associés à d'autres protéines G comme G_i (Sidhu *et al.*, 1991), G_o (Kimura *et al.*, 1995) et G_q (Wang *et al.*, 1995) ce qui pourrait expliquer certaines des interactions observées avec la Phospholipase C (PLC) par exemple (pour revue voir Sidhu, 1998). Il faut sans doute être plus critique vis-à-vis de ces "couplages" qui n'ont jamais vraiment été démontré formellement. Dans la plupart des cas, il s'agit plutôt d'interactions indirectes qui mettent en jeu la coactivation d'autres systèmes comme des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des protéines adaptatrices. Cette organisation modulaire des protéines de transduction confère un haut degré de spécificité spatiale et temporelle qui caractérise malgré leur large diversité la transmission des messages à travers la membrane plasmique.

L'analyse par mutagenèse dirigée et les chimères entre récepteurs sont des outils puissants pour étudier les liens structure/fonction et leurs relations avec l'activation cellulaire. Des chimères entre les récepteurs D_1 et D_2 montrent que l'activation de l'adénylate cyclase par les agonistes n'est détectable que dans les constructions qui contiennent la troisième boucle intracytoplasmique du récepteur D_1, probablement responsable du couplage à la sous-unité $G\alpha$ (Kozell *et al.*, 1994). A côté des expériences de délétion, les chimères sont des moyens moins "destructeurs" pour analyser les différentes régions impliquées dans le couplage aux protéines G (Näsman *et al.*, 1997). Ces chimères montrent également que pour le récepteur D_2 plusieurs

domaines cytoplasmiques sont requis pour l'activation, contrairement au récepteur D_1 (Kozell et Neve, 1997) où seule la troisième boucle intracytoplasmique semble nécessaire pour activer la protéine G_s. Des travaux plus détaillés sur le récepteur $ß_2$-adrénergique indiquent que la deuxième boucle intracytoplasmique et les parties N et C-terminales de la troisième boucle intracytoplasmique interviennent dans la spécificité récepteur/protéine G (pour revue voir Wess, 1998). L'homologie des récepteurs D_1 et des récepteurs ß-adrénergiques suggère qu'il pourrait en être de même pour les récepteurs D_1.

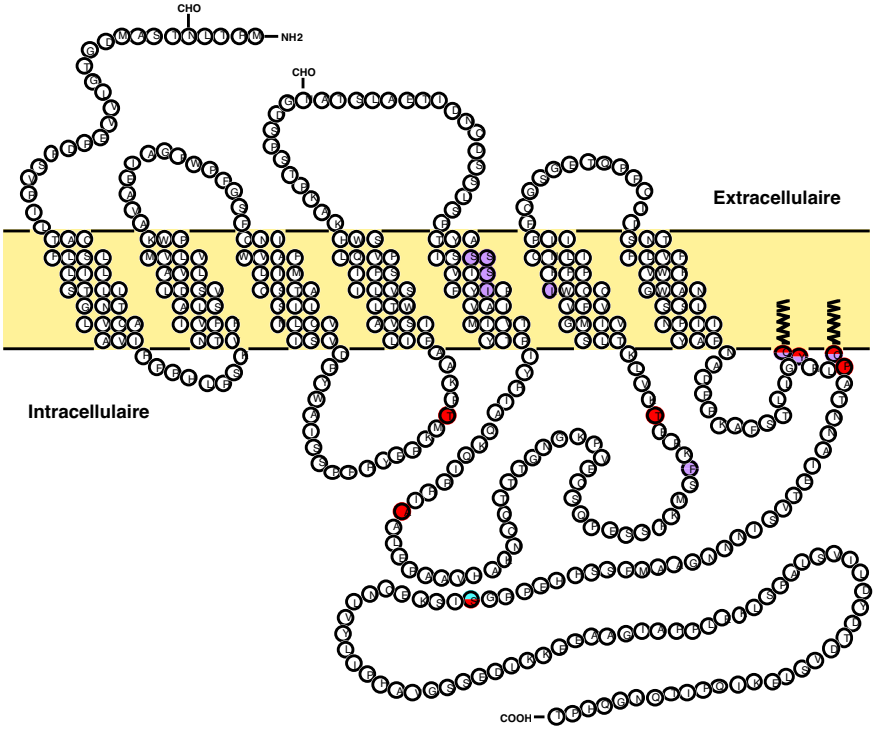
La conformation du récepteur est soumise à un grand nombre de contraintes, car la modification des segments transmembranaires engendre systématiquement des modifications des mécanismes de transduction ou des caractéristiques de liaison des ligands (Figure 14 et Figure 15). Cette contrainte se manifeste par le taux de conservation très élevé de la séquence de ces segments lorsque l'on compare les séquences alignées des récepteurs D_1 (plus de 70% d'identité). Le meilleur exemple de cette contrainte structurale intervenant sur la fonction du récepteur est la boucle supplémentaire crée par palmitoylation pour l'ancrage de la région C-terminale du récepteur à la membrane plasmique (pour revue voir Morello et Bouvier, 1996; Figure 2). Les mutations des cystéines impliquées dans la palmitoylation ont plusieurs implications. Pour le récepteur D_{1A} humain, les deux cystéines (Cys 347 et Cys 351) sont capables d'être palmitoylées (Jensen *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 1999). La délétion de la cystéine 351 n'affecte pas les fonctions principales du récepteur alors que celle de la cystéine 347 modifie le profil de liaison du récepteur mais aussi le couplage à l'adénylate cyclase et la désensibilisation du récepteur. En plus de ce rôle structural pour les récepteurs D_1 l'incorporation d'acide palmitique pourrait avoir un rôle de régulation, car elle augmente après traitement avec la dopamine (Ng *et al.*, 1994). La délétion de la cystéine 347 dans le récepteur D_{1A} humain empêche également le récepteur de se désensibiliser en présence d'agoniste (Jensen *et al.*, 1995). Sans palmitoylation, le récepteur ne pourrait plus former cette quatrième boucle intracytoplasmique nécessaire au couplage avec les protéines G. Toutefois les résultats observés sont en contradiction avec ceux de Jin et collaborateurs qui eux n'ont pas trouvé de modifications dans les profils de liaison ni dans l'activation de la cyclase lorsqu'ils effectuent la délétion de la cystéine (Jin *et al.*, 1997). Ce type de résultats se retrouvent pour d'autres récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi la modification des cystéines n'entraîne aucun changement pour les récepteurs de l'hormone lutheinisante (LH, Lutheinizing Hormone), le récepteur α_2-adrénergique, m_2 muscarinique et celui de l'hormone libérant la thyrotropine (TRH). Seuls les récepteurs $ß_2$-adrénergiques sont modifiés par cette délétion (Moffet *et al.*, 1993; O'Dowd *et al.*, 1989). Le couplage à la protéine G_s est alors impossible ce qui empêche son activation, et le récepteur présente un profil de phosphorylation typique d'un état phosphorylé. Toutes ces observations contradictoires renforcent l'idée que les



Récepteur	Réf	Mutation	Phénotype observé
D_{1A} Humain	1	Cys 347 Stop	Perte de l'affinité pour le SCH-23390
	2	Asp 70 Val Cys 106 Ala Ser 107 Gly	Modification de l'affinité pour la dopamine, les agonistes et antagonistes
		Ser 199 Val Ser 202 Ala	Modification de l'affinité pour les agonistes
		Trp 321 Tyr	Changement de l'affinité pour les antagonistes
	3	Phe 264 Ile	Augmentation de l'affinité
		Leu 286 Tyr	Perte de la liaison du ligand
	4	Ile 205 Ala	Peu de modification de la liaison
		Ile 205 Tyr	Peu de modification de la liaison
		Leu 286 Ala	Peu de modification de la liaison
	5	Ser 198 Ala Ser 199 Ala Ser 202 Ala	Différence dans la liaison de la dopamine
D_{1B} Humain	6	Gln 439	Augmente l'affinité de l'agoniste

Figure 14 : Les mutations qui modifient les propriétés de liaison des ligands des récepteurs D_1.

Sur cette figure sont représentées les mutations qui modifient la liaison des ligands spécifiques des récepteurs D_1. Les barres grisées dans le tableau indiquent que ce sont des mutations multiples. La séquence est celle du D_{1A} humain, la glutamine 439 a été indiquée et numérotée en accord avec l'alignement des séquences (Figure 4). Références : 1 (Jensen *et al.*, 1995), 2 (Tomic *et al.*, 1993), 3 (Pauwels et Wurch, 1998), 4 (Cho *et al.*, 1996), 5 (Pollock *et al.*, 1992), 6 (Demchyshyn *et al.*, 2000).



Récepteur	Réf	Mutation	Phénotype observé
D_{1A} Humain	1	Cys 347 Gly	Baisse de l'activité de la cyclase (48%) et pas de désensibilisation
		Cys 347 Stop	Baisse de l'activité de la cyclase (44%) et pas de désensibilisation
		Tyr 348 Stop	Baisse de l'activité de la cyclase (34%) et pas de désensibilisation
		Cys 351 Gly	Pas de changement de l'activité ni de la désensibilisation
		Cys 351 Stop	Pas de changement de l'activité mais pas de désensibilisation
		Pro 352 Stop	Pas de changement de l'activité mais pas de désensibilisation
	2	Leu 286 Ala	Augmentation de l'activité basale et stimulée
		Leu 286 Tyr	Perte de la transduction du signal
	3	Ile 205 Tyr	Baisse de l'accumulation d'AMPc
		Leu 286 Ala	Activité constitutive
		Leu 286 Tyr	Baisse de l'accumulation d'AMPc
	4	Ser 198 Ala	Baisse de l'accumulation d'AMPc
		Ser 199 Ala	
		Ser 202 Ala	
	5	Ser 380 Ala	Perte de la phosphorylation par la PKA *in vitro*
	6	Phe 264 Ile	Activité constitutive proche du D_{1B}
D_{1A} Humain et Rat	7	Thr 135 Val	Diminution de la vitesse de la désensibilisation sans en affecter l'amplitude maximale
	8	Ser 229 Ala	
		Thr 268 Val	
		Ser 380 Ala	
D_{1B} Humain	6	Ile 288 Phe	Annule l'activité constitutive du D_{1B}

Figure 15 : Les mutations qui modifient l'activité des récepteurs D_1.

Sur cette figure sont représentées les mutations qui modifient l'activité de l'adénylate cyclase ou les propriétés de désensibilisation des récepteurs D_1. Les barres grisées dans le tableau indiquent que ce sont des mutations multiples. La séquence est celle du D_{1A} humain. Références : 1 (Jensen *et al*., 1995), 2 (Pauwels et Wurch, 1998), 3 (Cho *et al*., 1996), 4 (Pollock *et al*., 1992), 5 (Zamanillo *et al*., 1995), 6 (Charpentier *et al*., 1996), 7 (Sibley *et al*., 1998), 8 (Jiang et Sibley, 1999).

récepteurs sont très sensibles aux environnements cellulaires, ce qui rend les analyses des mutations ponctuelles beaucoup plus difficiles.

IV.B. Transduction et formation de complexes supra-moléculaires (“transducisome”)

Nous avons montré au chapître III.B.2 que si des cellules telles que les neurones et les cellules épithéliales étaient polarisées, l'analogie entre les différentes régions de la membrane plasmique de ces cellules était difficile à faire. De ce fait, il n'existe probablement pas de règles générales qui gouvernent la localisation d'un sous-type donné de récepteur dans des compartiments de la membrane plasmique. Certains récepteurs sont retenus dans les compartiments intracellulaires de cellules hétérologues, comme c'est le cas pour les récepteurs D_2. Ces observations suggèrent qu'il manque un partenaire nécessaire à l'adressage ou à la rétention de ces récepteurs à la membrane plasmique. En outre, certains récepteurs sont clairement présents dans une région particulière de la membrane plasmique (Wozniak *et al.*, 1997). Ces différences de rétention pourraient être à l'origine de la formation de micro-domaines tels que les densités post-synaptiques. La formation d'un environnement spécifique favorable à la transduction du signal par les récepteurs est certainement un fait important pour expliquer la diversité d'action des récepteurs. Si la localisation subcellulaire de chacun des sous-types est identique ou très proche, la spécificité provient alors de mécanismes de couplages différents. Un aspect majeur de la transmission membranaire qui a été mis en avant ces dernières années est la nécessité d'assembler rapidement et efficacement tous les composants impliqués dans la transduction du signal. La formation de modules protéiques semble être une façon courante de permettre cette supra-organisation moléculaire (pour revue voir Lin et Pawson, 1997). Plusieurs protéines dont le rôle est de regrouper les composants d'une voie de transduction du signal depuis les récepteurs jusqu'aux effecteurs ont été découvertes. Deux types principaux de protéines semblent être impliqués : les guanylate kinases associées à la membrane ou MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) et les protéines à domaines PDZ seuls (pour revue voir Kim, 1997 et Tableau 5).

Protéine	Organisme	Récepteur	Autres Protéines	Fonction
MAGUK				
LIN-2/CASK	*C. elegans*	LET-23 RTK	LIN-7, LIN-10?	Localisation
LIN-2/CASK	Mammifères	Neurexin, Syndecan		
PSD-95/SAP90	Mammifères	NMDA, canal K+	nNOS, PSD-95	Regroupement Transduction
hDlg/Dlg/SAP97	Mammifères	Canal K+		Localisation
Chapsyn-110/PSD-93	Mammifères		nNOS	Regroupement
SAP102	Mammifères	NMDA		
Domaines PDZ seuls				
LIN-7	*C. elegans*	LET-23 RTK	LIN-2, LIN-10?	Localisation
InaD	*D. melanogaster*	Canal TRP	PLC, PKC	Localisation Transduction
Homer	Mammifères	mGluR		Localisation
GRIP	Mammifères	AMPA		

Tableau 5 : Rôle des protéines contenant des domaines PDZ dans les interactions avec les récepteurs (d'après Kim, 1997).

Abréviations : mGluR, metabotropic glutamate receptor; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; RTK, receptor tyrosine kinase; SAP, synapse-associated protein.

La plus connue des protéines MAGUK est la protéine PSD-95 ou SAP90. Chacune de ces protéines est capable par exemple d'associer les récepteurs NMDA aux canaux potassium ou de se lier avec une autre PSD-95. Le sous-type NR1 du récepteur NMDA n'a besoin que des sites de régulations de la Protéine Kinase C (PKC) pour former ces agrégats. Pourtant, certains variants d'épissage de NR1 sont capables d'interagir avec la protéine PSD-95 lors d'expérience de double-hybride dans la levure, l'association se faisant entre le 2ème domaine PDZ de PSD-95 et la région C-terminale du récepteur, qui porte un motif de type Thr/Ser-X-Val. Pour le récepteur AMPA, c'est dans la région C-terminale que le domaine d'association se trouve. La PKC contrôle aussi cette région par phosphorylation. La protéine PSD-95 pourrait alors servir d'adaptateur entre le récepteur et le cytosquelette. Approximativement 10% des récepteurs couplés aux protéines G contiennent ce motif de liaison aux protéines PDZ (Tableau 6). En fait, les protéines MAGUK possèdent plusieurs domaines PDZ associés à des domaines SH3. Sur la base de similitudes avec des protéines trouvées chez *Caenorhabitis elegans*, elles agiraient comme système d'ancrage pour localiser les récepteurs à la membrane plasmique à leur place définitive. Ces protéines pourraient changer les propriétés de cohésion des synapses en modifiant les interactions entre les molécules d'adhérence (Craven et Bredt, 1998). Mais la plus intéressante de leurs propriétés est qu'elles permettent d'associer les récepteurs à un système de transduction. Ainsi la PSD-95 se lie à l'enzyme capable de synthétiser du monoxyde d'azote dans les neurones, la nNOS (neural Nitric Oxyde Synthase), un effecteur des récepteurs NMDA (Brenman *et al.*, 1996). Mais pour le

moment ce sont surtout des observations qui ont été faites, et très peu d'analyses fonctionnelles ont été publiées en dehors de la drosophile et de *Caenorhabitis elegans*.

Récepteur	Type/Sous-type	Espèce
Humain		
VIP	1,2	
TSH-R		
Somatostatine	1, 2, 3, 5	
Purinergique	P2Y1	
NPY	2	
Glutamate métabotropique	1, 2, 3, 5	
IL-8	A, B	
Gal 1-R		
a-Adrénergique	1A	
ß-Adrénergique	1, 2	
5HT2	A, B, C	
Anaphylatoxine C3A		
Récepteurs d'autres espèces		
CXCR	2	Rat
CCKR	5	Souris
LPA		Souris
AMPc	CAR3	Dictyostelium
5HT1		Drospohile
Dopamine	1	Drosophile
Récepteurs orphelins		
Proto-oncogène mas		
UL33		
GPR12, 9, 8 et 3		
Protéines reliées aux GPCR		
Phospholipase Cß	3, 4	
GRK	2, 3	
Canal Potassium	Kir 1.4, 2.2, 2.3, 3.2	
Canal Calcium	Type-L	

Tableau 6 : Exemples de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) contenant un domaine de liaison aux protéines à domaines PDZ potentiel (d'après Neubig, 1998).

Les séquences des récepteurs couplés aux protéines G ont été obtenues à partir des banques de données. La séquence potentielle des domaines PDZ a été recherchée avec le programme Geneman. Sur les 179 séquences de récepteurs humains, 24 contenaient le motif de liaison PDZ.

Dans la deuxième classe de protéines se trouvent les protéines à domaines PDZ seuls qui peuvent se lier par exemple à la région C-terminale des récepteurs métabotropiques du glutamate ou aux récepteurs AMPA (Brakeman *et al*., 1997). Comme les protéines MAGUK, il semble que ces protéines puissent ancrer les récepteurs à la membrane pour former des sortes de micro-environnements cellulaires associant le récepteur et ses voies de transduction. C'est à partir des travaux effectués dans la rétine que les idées sur les phénomènes de complexe de transduction macromoléculaire se sont élaborées. Ainsi les récepteurs TRP (Transient Receptor Potential) et TRPL (TRP-Like) de l'œil de drosophile ne donnent une réponse *in vivo* en présence de lumière que si leur expression est conjointe (pour revue voir Scott et Zuker, 1998). Des études de

conductance et d'immunoprécipitation montrent que ces canaux forment des hétéromultimères. Dans ce complexe intervient la molécule INAD (Inactivation-No-Afterpotential D) qui possède cinq domaines PDZ. Elle assure le recrutement des canaux ioniques TRP, de la PKC et des effecteurs de la PLC. Ce complexe offre une grande sélectivité et rapidité dans la transmission de l'information. La détection des changements localisés dans la concentration du calcium est ainsi sensible et rapide. Une mutation dans le troisième domaine PDZ de la protéine INAD modifie la localisation des canaux TRP, et ceux-ci ne sont alors plus restreints aux rhabdomères (Chevesich *et al*., 1997). Les domaines PDZ interviennent aussi dans le regroupement des canaux potassium de type “shaker”, facilitent l'association de molécules d'adhésion cellulaire comme la fasciline II et contribuent à la distribution cellulaire de molécule comme LET23 (récepteur tyrosine kinase). Dans le modèle rétinien, de nombreuses molécules se lie à INAD : la rhodopsine majoritaire (Rh1), la PLC, la PKC, la calmoduline et les TRPL. Grâce à des interactions entre ses domaines PDZ, la protéine INAD est capable d'homomultimérisation, ce qui augmente la taille des complexes susceptibles de se former. De plus, le contrôle transcriptionnel de certaines des protéines de la même famille comme la protéine Homer capable de fixer le récepteur AMPA, indique que ces molécules d'ancrage sont non seulement capables d'assurer la localisation correcte des récepteurs mais aussi d'intervenir dans la régulation de leur activité (Brakeman *et al*., 1997).

La formation de complexes supra-moléculaires pourrait donc permettre le couplage à différentes voies de signalisation cellulaire en fonction de la présence ou non des protéines capables de s'associer au récepteur (Figure 16). C'est le cas de la protéine calcyon, trouvée récemment grâce à son interaction avec le récepteur D_{1A} humain (Lezcano *et al*., 2000). Cette protéine est colocalisée avec le récepteur dans certaines régions du cerveau comme le cortex et l'hippocampe. La microscopie électronique montre que, dans ces régions, la protéine se retrouve à la périphérie des dendrites post-synaptiques dans les épines dendritiques, où elle est colocalisée avec le récepteur D_{1A}. Des analyses fonctionnelles ont montré qu'en présence de cette protéine, les récepteurs D_{1A} exprimés dans un système hétérologue étaient capables de libérer le calcium intracellulaire en augmentant le couplage du récepteur à la protéine $G_{q/11}$. C'est la présence de l'agoniste qui semble capable de produire cette interaction récepteur/calcyon. De plus, des expériences préliminaires semblent montrer que cette protéine est aussi capable d'interagir avec le récepteur D_{1B} humain.

D'autres protéines ont été identifiées pour intervenir dans la formation des micro-domaines membranaires. La rapsyne par exemple, est localisée dans les associations de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine. En son absence, il n'y a pas de regroupement de récepteurs, ni de liens avec le cytosquelette. L'agrine joue un rôle dans l'induction de ces associations de récepteurs que l'on retrouve à la jonction neuromusculaire. La gephyrine encore,

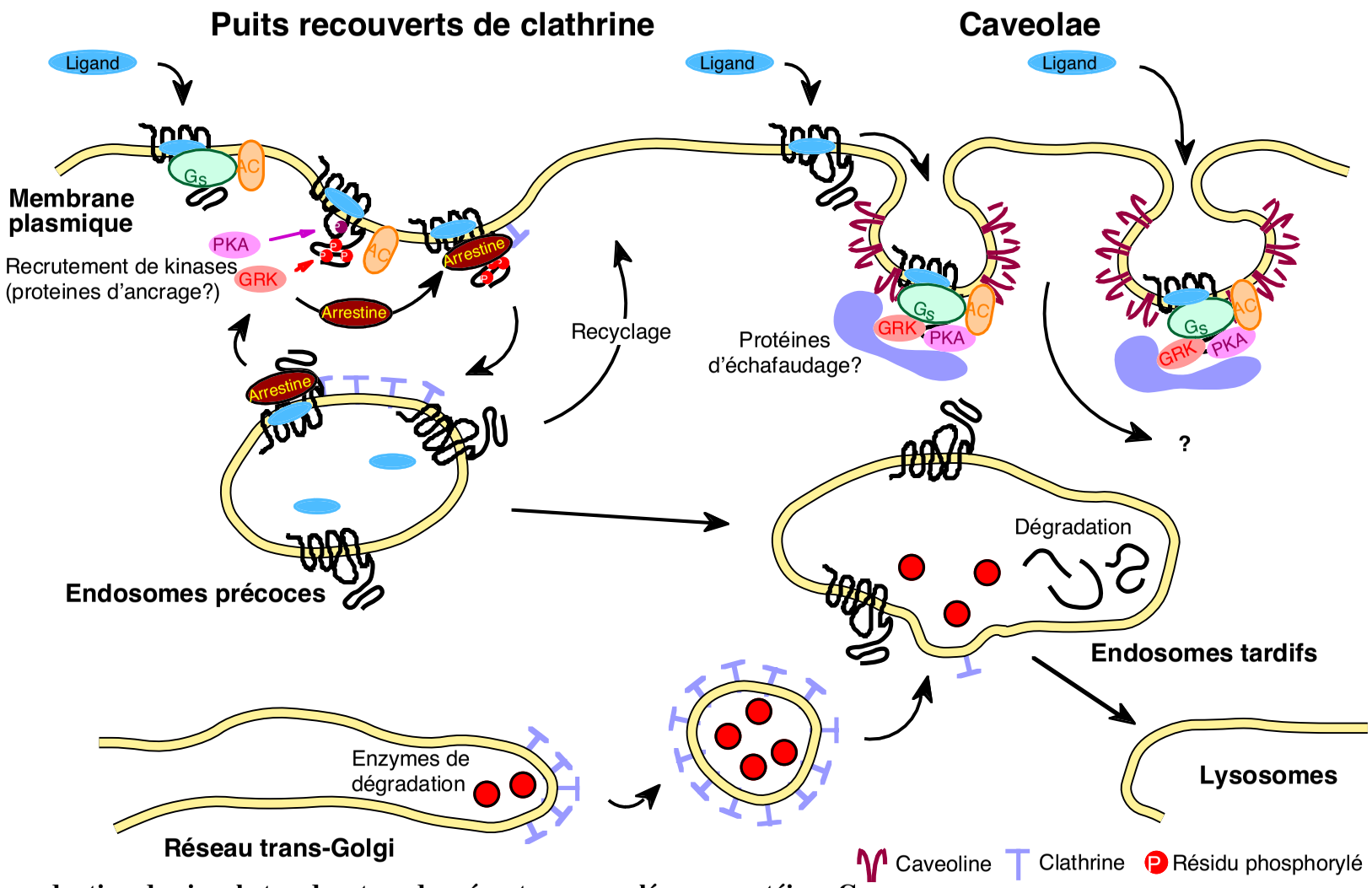


Figure 16 : Transduction du signal et endocytose des récepteurs couplés aux protéines G.

Sur ce schéma, les deux voies connues d'endocytose sont représentées. La première voie fait intervenir les vésicules recouvertes de clathrine. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, celui-ci active les protéines G (Gs) et l'adénylate cyclase (AC). Avec l'aide probable de protéines d'ancrage, des protéines kinases (PKA et GRK) sont recrutées à la membrane plasmique. Elles phosphorylent le récepteur et facilitent la liaison des protéines arrestines qui agissent comme adaptateur entre le récepteur et la clathrine. L'endocytose du récepteur s'effectue alors vers les endosomes précoces, puis, plus tard, vers la voie de dégradation ou bien par recyclage vers la surface. La seconde voie d'endocytose fait intervenir les caveolae. Ces vésicules sont plus petites que les vésicules recouvertes de clathrine et contiennent de grande quantité de cavéolines. Ces protéines pourraient agir comme un échafaudage pour assurer le contact entre le récepteur et ses voies d'activation en formant un macro-complexe appelé "transducisome". Lorsque le ligand rejoint le récepteur dans ou hors des caveolae, la cellule est alors prête pour assurer la transduction du signal puisque toutes les protéines nécessaires sont rassemblées dans les caveolae.

est, quant à elle, capable d'agréger les récepteurs de la glycine dans les synapses axo-dendritiques et d'assurer la liaison avec les microtubules du cytosquelette.

Toutes ces observations convergent pour faire émerger la notion de “transducisome” (Figure 16). Cette structure modulaire de composition variable contient toutes les protéines impliquées dans la transmission d'un signal spécifique du récepteur aux principales cascades de signalisation (Tsunoda *et al.*, 1998). Ces mécanismes conservés des nématodes à l'homme peuvent rendre compte de la diversité des récepteurs ayant des caractéristiques proches et des localisations cellulaires semblables. Ainsi, grâce à des protéines d'“échafaudage”, les récepteurs pourraient agir sur des voies de signalisation cellulaire différentes bien qu'ils soient colocalisés à l'intérieur d'une même cellule. Toutefois, l'expression des récepteurs dans des cellules qui diffèrent par leur contenu en protéines qui composent les voies de signalisation intracellulaire peut souvent expliquer les réponses différentes observées pour un même récepteur (Paolillo *et al.*, 1999). Ainsi les cellules granulaires du cervelet sont riches en sous-unités RI_{α} et RII_{α} alors que les neurones corticaux contiennent $RII_{ß}$. Cette différence de composition peut-être à l'origine de la différence de transmission du signal de l'AMPc vers le noyau. Contrairement à l'idée classique, il ne semble pas y avoir de mécanisme de navette entre les récepteurs, les protéines G et les effecteurs. Il sembe plutôt que la fixation du ligand et l'activité du récepteur qui en résulte affecte la réponse générée par le complexe supra-moléculaire incluant les protéines G, le récepteur et l'adénylate cyclase (Chidiac, 1998).

En plus de ces protéines spécifiques permettant de monter cet “échafaudage” de la transduction, les effecteurs eux-mêmes contiennent des domaines permettant des interactions multiples. C'est le cas des sous-unités ßγ des protéines G et de leur domaine d'homologie avec la pleckstrine (domaine PH, Pleckstrin Homology; pour revue voir Inglese *et al.*, 1995; Lemmon et Ferguson, 1998; Rebecchi et Scarlata, 1998). Ces domaines sont présents chez de nombreux effecteurs de cette sous-unité comme la dynamine (Liu *et al.*, 1997; Scaife et Margolis, 1997). Le rôle de ces domaines pourrait être, sous l'effet d'un agoniste, de permettre le recrutement à la membrane, de toutes les protéines nécessaires à la transduction correcte du signal (Shaw, 1996; van Biesen *et al.*, 1996). Si le phénomène de “mobilisation membranaire” est démontré pour les éléments de la voie de transduction du signal, l'existence d'un mécanisme similaire reste discuté pour les récepteurs eux-mêmes. Des expériences effectuées sur des lignées épithéliales de rein (LLCP-K1) ont mis en évidence (Holtbäck *et al.*, 1999) que le traitement par le neuropeptide Y ou le peptide natriurétique atrial entraîne la relocalisation des récepteurs α_1-adrénergiques et D_1 dopaminergiques depuis un compartiment cytoplasmique vers la membrane plasmique. Cette translocation a lieu dans les secondes qui suivent le traitement par les peptides.

Il existe une base morphologique à cette notion de “transducisome”, plusieurs expériences montrent que les caveolae, structures membranaires impliquées dans l'endocytose constitutive, contiennent un grand nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal comme les protéines G hétérotrimériques, les protéines tyrosine kinases Src et les GTPases Ras (Li *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996 et Tableau 7). La caveoline 1, protéine constituante des caveolae, se lie d'ailleurs préférentiellement à la forme inactive GDP des protéines G et peut réguler leur activité (Li *et al.*, 1995). En fait, l'analyse précise de la localisation des effecteurs du signal des récepteurs couplés aux protéines G montre que les protéines G hétérotrimériques et l'adénylate cyclase se regroupent dans les caveolae (Huang *et al.*, 1997). La localisation des protéines G dans des domaines membranaires lipidiques (raft) précurseur des caveolae se fait par des modifications lipidiques des protéines (Moffet *et al.*, 2000). La myristoylation et la palmitoylation sont suffisantes pour associer $G_{\alpha s}$ et les “raft”. De plus, la prénylation des sous-unités $G_{\beta\gamma}$ les exclut de ces mêmes structures. D'autres expériences effectuées par fractionnement cellulaire et immunocytochimie avec des protéines régulatrices des protéines G (RGS-GAIP), montrent qu'elles interagissent avec la clathrine et les vésicules d'endocytose dérivées de la membrane plasmique, dans le réseau *trans*-Golgien (De Vries *et al.*, 1998). Dans les caveolae, on retrouve d'ailleurs la protéine nNOS ciblée dans ce domaine par palmitoylation (García-Cardeña *et al.*, 1996; Shaul *et al.*, 1996). Cette compartimentalisation renforce le concept de complexe supra-moléculaire associé à des structures particulières de la membrane plasmique. Ces sous-domaines permettent d'optimiser l'efficacité et la fidélité de la transduction du signal en couplant le récepteur aux modules de transduction de façon rapide et efficace (Figure 16).

Classes de molécules	Noms
Lipides	Ganglioside, sphingomyéline, céramide, diacyglycérol et cholestérol
Protéines acétylées	Protéines G hétérotrimèriques, E-NOS, CD-36 et caveoline
Protéines ancrées GPI	Phosphatase alkaline, prion, CD-14, urokinase et nucléotidase en 5'
Protéines prénylées	Ras et Rap1A
Récepteurs membranaires	Récepteur du PDGF, de l'insuline, de l'EGF, de la CCK, de la bradykinine, de l'endothéline récepteur m_2 acétylcholine et ß adrénergique
Transduction du signal	PKCα, Shc, Sos, Grb2, MAPK, adénylate cyclase, PI3 kinase, Raf1, calmoduline et phosphoinositides
Transporteur membranaire	Porine, récepteur de l'IP3, ATPase Ca2+, aquaporine-1 et ATPase H+
Molécules de structures	Annexine II, ezerine, myosine, VAMP, NSF et actine

Tableau 7 : Liste partielle des molécules enrichies dans les caveolae (d'après Anderson, 1998).

Abréviations : NOS, Nitric Oxyde Synthase; PDGF, Platelet-Derived Growth Factor; EGF, Epidermal Growth Factor; CCK, Cholecystokinin; PKC, Protein Kinase C; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase.

Ces dernières années, le rôle de ces protéines “d'échafaudage” semble de plus en plus important et les démonstrations d'interactions entre des récepteurs couplés aux protéines G et d'autres protéines sont de plus en plus nombreuses. Ces interactions permettent d'expliquer les effets non “classiques” des récepteurs. Ainsi les récepteurs $ß_2$-adrénergiques sont capables d'interagir avec l'échangeur d'ions Na+/H+ par l'intermédiaire d'un facteur d'échange (Hall *et al.*, 1998). Cette interaction fait intervenir un domaine PDZ de la protéine qui interagit avec le C-terminal du récepteur $ß_2$. Afin de bien comprendre les modulations possibles des voies de signalisation par les différents sous-types du récepteur D_1, il est nécessaire de les passer en revue.

IV.C. Modulation des voies de signalisation intracellulaire par les récepteurs D_1

Le fait que les différences d'affinité pour l'agoniste naturel, la dopamine, soient modestes pour les différents sous-types du récepteur D_1, même si elles sont significatives, suggère que d'autres paramètres fonctionnels aient justifié la conservation de ces sous-types après duplication génique. Ces paramètres concernent évidemment soit la nature des voies de signalisation intracellulaires, soit l'efficacité de leur activation. Les premières analyses moléculaires des voies de transduction des récepteurs de la dopamine ont été effectuées dans des tissus ou des tranches de cerveau. Ce type de matériel n'est pas adapté à l'analyse détaillée des sous-types, du fait de l'expression souvent simultanée de différents sous-types du récepteurs D_1. Grâce au développement du clonage des gènes des récepteurs, l'expression d'un sous-type particulier dans des cellules hétérologues a été rendu possible. La très grande diversité des réponses cellulaires observées semble indiquer que la transduction du signal est dépendante des types cellulaires étudiés. Les combinaisons variées permises par la formation des assemblages supra-moléculaires lors de la formation du complexe de transduction rendent les récepteurs sensibles aux micro-environnements cellulaires. Ainsi, les localisations distinctes des effecteurs dans la cellule permettent de répondre différemment au même mécanisme d'activation. En plus de cet arrangement spatial, la réponse de la cellule dépend également d'une mobilisation progressive au cours du temps des différents acteurs de la transduction au cours de la vie de la cellule comme lors de la différenciation. Cette possibilité rend compte de la large variabilité des réponses cellulaires observées après stimulation des récepteurs D_1 de la dopamine dans des systèmes homologues ou hétérologues.

IV.C.1. Les voies de signalisation “historiques”

La première réponse cellulaire analysée après activation des récepteurs D_1 fut l'activation de l'adénylate cyclase mesurée par accumulation de l'AMPc. Cette caractéristique a été utilisée pour servir de base à la discrimination des deux grandes classes D_1 et D_2 de récepteurs (Kebabian et Calne, 1979). La production d'AMPc après activation de l'adénylate cyclase est un processus très conservé chez tous les eucaryotes, et correspond donc naturellement à un critère majeur de classification des récepteurs D_1. Ainsi, le récepteur D_{1B} possède une activité intrinsèque élevée d'activation de l'adénylate cyclase chez plusieurs espèces (Cardinaud *et al.*, 1997; Sugamori *et al.*, 1994; Tiberi et Caron, 1994). Néanmoins, le récepteur D_{1C} qui possède un profil pharmacologique intermédiaire entre les récepteurs D_{1A} et D_{1B} ne peut pas être discriminé sur ses valeurs basales d'accumulation d'AMPc (Cardinaud *et al.*, 1997; Sugamori *et al.*, 1994). Si l'activation de l'adénylate cyclase est la voie de transduction majoritaire pour les récepteurs D_1, d'autres processus de signalisation ont été observés.

Des études sur des cultures de striatum montrent que la dopamine active les protéines PKC via par les récepteurs D_1 (McMillian *et al.*, 1992). Un effet sur la rétraction des neurites a été observé dans des cellules de la rétine de poisson rouge. Cet effet est bloqué par un antagoniste D_1 et mimé avec un activateur de la PKC ou un analogue du diacylglycérol (Rodrigues et Dowling, 1990).

L'activation de la PLC sur des tranches de cerveau est observée après un traitement avec du SKF-38393, agoniste spécifique des récepteurs D_1. L'analyse des capacités de stimulation de la PLC avec différents composés sur des tranches ou des extraits membranaires de striatum ne montre pas de corrélation qui suggérerait que différents sous-types du récepteur D_1 pourraient médier cette activation (Undie *et al.*, 1994). Cet effet a aussi été observé dans les membranes de cortex de rein (Felder *et al.*, 1989), la deuxième plus importante localisation des récepteurs D_1 après le système nerveux central. Mais cette modification du métabolisme des phosphinositols a été observée dans le cerveau (Undie *et al.*, 1994) bien que les concentrations d'agonistes utilisées (100μM) soient loin d'être physiologiques. Des expériences effectuées sur des fibroblastes Ltk- stimulent l'hydrolyse des phosphinositols dans des concentrations plus basses (Liu *et al.*, 1992), ce qui indique que ce mécanisme reste tout de même spécifique des récepteurs D_1. De plus, le traitement à la toxine cholérique indique que ce phénomène pourrait être médié par les protéines G_s. Cependant, la découverte récente de la protéine calcyon capable d'associer les récepteurs D_1 et les canaux calciques montre que la signalisation à travers cette voie PLC proviendrait d'une interaction dans un complexe multiprotéique (Lezcano *et al.*, 2000).

IV.C.2. La dopamine et les canaux ioniques

Plusieurs travaux publiés suggèrent que les récepteurs D_1 sont capables de moduler l'activité des canaux potassiques dépendant du voltage. Les récepteurs D_1 sont en effet capables d'augmenter la sortie de potassium dans des cellules de la rétine de poulet (Laitinen, 1993). Les taux d'AMPc ne semblent pas modifier ces flux de potassium, ce qui laisse penser que l'on a à faire à un mécanisme indirect qui ne passe pas par l'activation de l'adénylate cyclase. Des mécanismes plus complexes agissants par l'intermédiaire de la Protéine Kinase A (PKA) semblent aussi intervenir pour moduler les canaux potassiques toujours sans que l'implication des récepteurs D_1 soit directe (Liu *et al.*, 1992). Sur ce sujet, les résultats sont contradictoires puisque les agonistes des récepteurs D_1 ont été montrés capables d'inhiber ces mêmes courants potassium dans les neurones de striatum de rat (Kitai et Surmeier, 1993).

L'injection d'ARNm de striatum de rat dans des ovocytes de xénope montre qu'en plus de l'activation de l'adénylate cyclase, un traitement à la dopamine entraîne une production d'inositol triphosphate et une mobilisation du calcium endogène (Mahan *et al.*, 1990). Cependant les analyses de surexpression dans les ovocytes de xénope sont à prendre avec précaution. L'utilisation de ces cellules qui accumulent un nombre très important de molécule de signalisation pour assurer le développement de l'embryon tend naturellement à favoriser les interactions entre de très nombreuses voies de signalisation et à masquer une spécificité présente dans des cellules neuronales. Le problème principal des ovocytes de xénope est qu'ils contiennent une quantité énorme de canaux chlore. Donc, quelles que soient les voies de signalisation auxquelles les récepteurs exprimés dans l'ovocyte sont couplées, la réponse est en générale une augmentation de la perméabilité au chlore. Néanmoins, les récepteurs naturellement couplés à l'Inositol-3-Phosphate (IP3) sont extrêmement favorisés dans ce système d'expression. De plus, les interactions qui pourraient exister entre les récepteurs D_1 et les canaux calciques sont très controversées. Les expressions des différents types de récepteurs dans des cellules COS-7, CHO ou BHK n'ont jamais permis de montrer une quelconque modification de l'activité de ces canaux (Dearry *et al.*, 1990; Demchyshyn *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1994; Sugamori *et al.*, 1994; Tiberi *et al.*, 1991). L'ouverture des canaux calcium est pourtant observée dans des cellules GH4C1 (hypophyse de rat) dans lesquelles le récepteur D_1 est exprimé (Liu *et al.*, 1992). L'expression stable du récepteur D_{1A} humain dans des cellules HEK 293 a aussi permis de mettre en évidence cette interaction avec les canaux calcium (Lin *et al.*, 1995). Cette interaction dépend visiblement de l'accumulation d'AMPc et ne semble pas induire de modification dans l'hydrolyse des phosphoinositols.

Pour finir, dans des préparations de vésicules membranaires provenant de la bordure en brosse rénale, les agonistes D_1 inhibent l'activité de l'échangeur Na+/H+ (Felder *et al.*, 1993).

Enfin, l'ATPase Na+/K+ dépendante semble aussi être régulée par les récepteurs D_1 (Horiuchi *et al*., 1993) même si certaines expériences soulignent l'effet synergique des D_1 et des D_2 sur cette régulation (Bertorello *et al*., 1990).

IV.C.3. La dopamine comme facteur de croissance.

En dehors des effets de la dopamine sur les voies métaboliques ou l'excitabilité des neurones, un ensemble de données convaincantes montrent que les neuromédiateurs sont capables de se comporter comme des signaux agissant sur la différenciation, la prolifération, la survie, la mobilité cellulaire, la croissance des axones et l'expression des gènes qui contribuent à ces phénomènes (pour revue voir Weiss *et al*., 1998). Tous ces effets sont très proches de ceux provoqués par d'autres molécules de régulation comme les facteurs de croissance et les neurotrophines, ou modulés par les proto-oncogènes. Cependant, si les voies de signalisation intracellulaire impliquées directement en aval des récepteurs aux neuromédiateurs sont plutôt bien connues, la succession précise des évènements intervenant dans le recrutement des différentes voies de signalisation l'est beaucoup moins. En particulier, il est très difficile de savoir comment les différents messagers intracellulaires activés par un neurotransmetteur donné, peuvent être interprétés, pour finalement générer une réponse cellulaire appropriée à la situation de l'organisme.

Récepteur	Cancer	Mécanismes
Thyroid-stimulating hormone (TSH) Luteinizing hormone (LH)	Adénomes thyroïdiens Hyperplasie des cellules de Leydig	Mutation à activité constitutive
Neuropeptides et prostaglandines : Bombesine Gastrin-releasing peptide Neuromedin B Cholecystokinine Galanine Neurotensine Vasopressine	Cancer du poumon Adénome du colon Carcinomes Hyperplasie gastrique	Stimulation autocrine et paracrine
Récepteurs aux chémoquines	Leucémies et lymphomes	Séquences de virus à ADN Cytomégalovirus Virus de l'herpès

Tableau 8 : Implications démontrées des récepteurs couplés aux protéines G dans la formation des cancers humains (d'après Gutkind, 1998a; Gutkind, 1998b; van Biesen *et al*., 1996).

Il existe aussi un ensemble d'arguments qui montre l'effet directement oncogénique de certains récepteurs couplés aux protéines G. Un effet transformant est obtenu *in vitro* dans des

cellules NIH-3T3, en y introduisant un mutant constitutivement actif du récepteur α_{1B}-adrénergique (Allen *et al.*, 1991). Récemment, des mutations activatrices ont été trouvées dans certains types de cancers, tels les adénomes de la thyroïde. Les effets, autocrine ou paracrine, des neuropeptides agissant sur leurs récepteurs contribuent probablement au développement de certaines néoplasies humaines. Enfin, des séquences codant pour des récepteurs couplés aux protéines G ont été retrouvées dans le génome de virus à ADN. Ces observations soulignent l'importance du rôle des récepteurs couplés aux protéines G dans l'apparition et le développement des cancers (Tableau 8).

Les voies de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation des protéines MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK) permettent la transmission des signaux perçus au niveau de la membrane vers des effecteurs intracellulaires très variés. L'activation de ces voies est notamment responsable de la modulation de la transcription de gènes spécifiques, impliqués dans le contrôle de processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose ou les réactions inflammatoires. Cette modulation est l'aboutissement de cascades d'évènements complexes faisant intervenir en particulier d'autres protéines kinases (parmi lesquelles les protéines de la famille Raf), dont le dérèglement a été impliqué dans l'émergence de nombreux cancers. Trois sous-familles de protéines MAPK ont été caractérisées chez les vertébrés : les protéines ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (Jun N-terminal Kinases) et p38. La voie de signalisation des protéines ERK, la plus anciennement connue, peut être activée par stimulation de différents types de récepteurs : les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK) ainsi que des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques.

Plusieurs exemples permettent d'illustrer comment les récepteurs des neurotransmetteurs peuvent modifier l'état de différenciation ou la prolifération cellulaire. Diverses classes de récepteurs couplés aux protéines G qui modulent l'activité de l'adénylate cyclase ou qui activent la PLC peuvent stimuler ou inhiber la prolifération cellulaire et la croissance des prolongements neuronaux (Weiss *et al.*, 1998). Dans le cas des sous-types de récepteurs adrénergiques exprimés dans les cellules PC12 de phéochromocytome de rat (Williams *et al.*, 1998), l'analyse des voies MAPK montre que :

- La stimulation des récepteurs α_{1A} entraîne la différenciation des cellules PC12 en activant les trois voies des MAPK: ERK, JNK, p38.
- La différenciation obtenue après stimulation des récepteurs $ß_1$ n'est possible qu'avec une activation simultanée des récepteurs RTK du Nerve Growth Factor (NGF).

- Une étude proche a été menée dans les cellules CHO, pour les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Wylie *et al.*, 1999). Dans cette lignée, après stimulation à l'acétylcholine, le sous-type M_3, couplé à la PKC, induit l'activation des voies JNK et ERK. Par contre, le sous-type M_2, inhibiteur de l'adénylate cyclase, stimule uniquement la voie ERK.

Toutes ces expériences font des récepteurs couplés aux protéines G au même titre que les récepteurs à activité tyrosine kinase, une famille de régulateurs des voies MAPK importante (Figure 17).

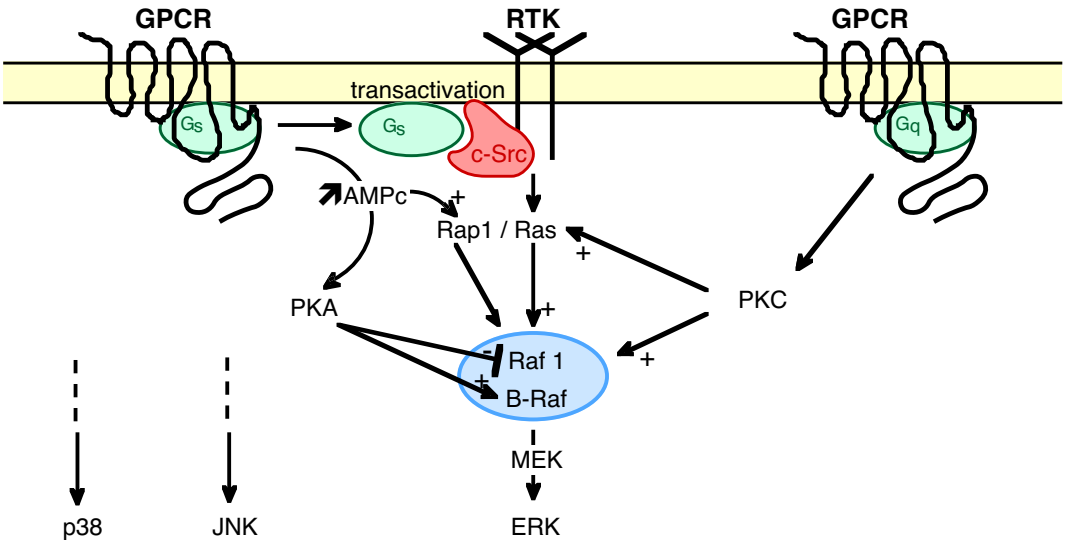


Figure 17 : Schéma récapitulatif des interconnexions entre les récepteurs couplés aux protéines G et les voies des MAPK.

IV.C.4. La dopamine et les voies des MAPK

Quelques travaux impliquent la dopamine dans différents phénomènes de développement du système nerveux comme la croissance des neurites, la sélection de cibles des axones et la formation de synapses (Spencer *et al.*, 1998). En activant la PKC par l'intermédiaire du diacylglycérol (DAG), la stimulation des récepteurs D_1 provoque la rétraction des neurites des cellules horizontales de la rétine d'un poisson téléostéen maintenues en culture (Rodrigues et Dowling, 1990). Toutefois, des effets opposés ont été observés sur des neurones striataux de rat en culture (E17). Ainsi, après 1 heure de traitement à la dopamine ou avec un agoniste D_1, on observe une augmentation du nombre des cônes de croissance, de la taille des neurites, et de l'arborisation (Schmidt *et al.*, 1996). Ces modifications morphologiques restent stables après 24 heures, ce qui semble indiquer un véritable phénomène de différenciation.

Depuis 1998, l'effet de la dopamine sur l'activation des voies MAPK a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Le rôle physiologique de cette signalisation est confirmé par l'observation de la régulation différentielle de l'expression du gène *c-fos* (gène précoce de réponse à l'augmentation d'AMPc) et des facteurs de régulations CREB (cAMP Response Element Binding protein) lors du développement du striatum (Arnauld *et al.*, 1998; Wirtshafter, 1998). Ainsi le SKF-38393, l'agoniste D_1 de référence, n'est pas capable d'induire l'expression de *c-fos* dans le striatum autrement qu'au cours du développement postnatal précoce. Dans des cultures primaires de neurones striataux, les voies MAPK p38 sont phosphorylées après activation spécifique des récepteurs D_1 par l'agoniste SKF-38393 (Vincent *et al.*, 1998), cette activation semble dépendante de la PKA. Une étude plus complète effectuée dans un neuroblastome humain exprimant de façon constitutive les récepteurs D_{1A} (SK-N-MC) a permis de montrer que l'emploi de l'agoniste SKF-38393 active de façon maximale, après 15 minutes de traitement à 100μM, les voies p38 et JNK sans modifier les voies ERK (Zhen *et al.*, 1998). Ce phénomène, inhibé par le SCH-23390, est vraisemblablement dépendant de la voie PKA. Finalement des expériences récentes utilisant des cellules de neuroblastomes humains montrent que la dopamine active les MAPK p38 et JNK après différents temps de traitement au SKF-38393 (Zhen *et al.*, 1998). Ces deux familles de protéines participent au processus de transduction du signal impliqué dans les réponses environnementales ou au stress. Les phosphorylations observées sont dépendantes de l'activation des protéines PKA et PKC.

Le très grand nombre de voies de signalisation activées après la fixation des agonistes sur les récepteurs D_1 de la dopamine ne permettent pas facilement de relier un mode de transduction avec un sous-type particulier du récepteur D_1. Si la spécificité transduction/récepteur paraît donc dépendre des conditions de l'environnement cellulaire, il se peut que la régulation de l'activité soit spécifique de chacun des sous-types. Ainsi, les propriétés intrinsèques différentes de chacun des sous-types interviendraient plutôt dans l'adaptation fine de la réponse au neuromédiateur. De plus, si la signalisation dépend de l'environnement cellulaire, de la nature des effecteurs et des protéines d'échafaudage au voisinage du récepteur (la composition du transducisome), elle dépend aussi du décours temporel du recrutement de ces effecteurs vers le récepteur. Par exemple, les modulations de l'activité de l'adénylate cyclase et des canaux ioniques est rapide (couplage quasi direct avec les protéines G). En revanche, l'activation des voies des MAPK est plus lente, à cause sans doute du recrutement d'activateurs spécifiques. De plus la réponse découlera de l'état dans lequel se trouve cette voie de signalisation au moment où le récepteur est activé. Au total, la réponse cellulaire participe d'un ensemble de conditions qui reposent sur l'organisation spatiale du transducisome, de l'activité simultanée d'autres voies de signalisation, et enfin du moment où survient l'activation du récepteur. C'est pour cet ensemble de raison qu'il

semble infiniment plus intéressant et justifié d'analyser l'activité d'une voie de signalisation dans une situation expérimentale précise.

IV.D. Le cas du récepteur D_{1B} : un récepteur constitutivement actif

Maladie	Récepteur
Rétinis Pigmentosa	Rhodopsine
Cécité congénitale	Rhodopsine
Puberté mâle précoce familiale	Récepteur Hormone Luteinisante
Hyperthyroïdisme familial	Récepteur Thyréotropine
Adénomes hyperfonctionnels de la thyroïde	Récepteur Thyréotropine
Hypo-parathyroïdisme autosomal dominant	Récepteur Calcium
Chondroplasie de Jansen	Récepteur Hormone Parathyroïde/Peptide relié à l'Hormone Parathyroïde

Tableau 9 : Expression de formes constitutivement actives de récepteurs impliquées dans des maladies (d'après Leurs *et al.*, 1998)

Ce phénomène d'activité constitutive observé pour le récepteur D_{1B} pourrait être impliqué dans plusieurs situations physiologiques et certaines maladies (Arvanitakis *et al.*, 1998 et Tableau 9). La compréhension de la façon dont les récepteurs sont activés a été obtenue par des mutations substitutives dans l'extrémité C-terminale de la troisième boucle intracytoplasmique (pour revue voir Leurs *et al.*, 1998). Ces modifications entraînent une activation agoniste indépendante appelée aussi activité “intrinsèque” du récepteur (Perez *et al.*, 1996; Samama *et al.*, 1993). Prendre en compte l'activité intrinsèque du récepteur facilite la compréhension des effets de certains composés appelés agonistes inverses qui tendent à diminuer le niveau d'activité basale des récepteurs (Pauwels et Wurch, 1998 et Tableau 10). Alors que les antagonistes au sens strict ne modifient pas l'activité des récepteurs, l'agoniste inverse stabilise son état inactif et diminue l'état d'activation. Ainsi, avec le récepteur D_{1B} de rat, les antagonistes comme la clozapine, le cis-flupenthixol, le (+)-butaclamol, l'halopéridol, la chlorpromazine et la fluphenazine diminuent l'activité basale de l'adénylate cyclase (Cai *et al.*, 1999). Par contre, le SCH-23390 et le (-)-butaclamol sont sans effet. Dans le cas des agonistes inverses, en plus de cette baisse d'activité, on remarque une perte du couplage à G_s pouvant atteindre 80%. Ces mécanismes ont des implications thérapeutiques importantes qui n'ont commencé a être explorées de manière systématique que récemment. Les dosages d'accumulation d'AMPc à l'état basal montrent que le récepteur D_{1B} possède cette activité constitutive. Une des premières analyses d'expression des récepteurs D_{1A} et D_{1B} humain dans des cellules hétérologues CHO et BHK avait montré que la stimulation de la cyclase par la dopamine était 20 fois plus forte pour le D_{1B} que pour le D_{1A} (Pedersen *et al.*, 1994). Seulement, les lignées stables employées

n'exprimaient pas les deux sous-types du récepteur D_1 au même taux. L'emploi du flupentixol ou du butaclamol est capable de réduire l'activation basale du récepteur D_{1B} au niveau de celui du récepteur D_{1A} (Cardinaud *et al.*, 1997). La recherche de régions importantes pour l'existence de cette activité constitutive a été entreprise grâce à la fabrication de chimères entre les récepteurs D_{1A} et D_{1B} humain (Iwasow et Nantel, 1999). En échangeant les régions C-terminales (à partir du site Bcl I du 6ème segment transmembranaire) le récepteur D_{1A}/D_{1BTRL} (Terminal Receptor Locus) possède une affinité augmentée pour la dopamine, proche de celle du D_{1B} naturel, ainsi que la même activité constitutive. En revanche, l'activation maximale n'est pas modifiée dans ces chimères mais plutôt dans celles dont la troisième boucle extracytoplasmique a été intervertie. Les mutations Phe 264 Ile et Leu 286 Ala rendent le récepteur D_{1A} humain constitutivement actif (Charpentier *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1996). Plus précisément, la substitution entre les acides aminés Phe 264 pour le D_{1A} et Ile 288 pour le D_{1B} permet d'intervertir les activités basales de ces récepteurs (Charpentier *et al.*, 1996). Une des conséquences de cette activité constitutive des récepteurs est l'apparition d'une inhibition “agoniste-indépendante” de l'adénylate cyclase et une augmentation de la phosphorylation des récepteurs par les GRK (G Protein-coupled Receptor Kinase), comme celle observée pour les récepteurs α_{2A} et $ß_2$-adrénergique (Pei *et al.*, 1994b).

Sous-type de récepteurs	Espèce	Méthode d'étude	Type cellulaire
$ß_2$ Adrénergique	Humain	AMPc, physiologie	NG108-15, SF9, érythrocytes
Bradykinine B2	Rat	Hydrolyse PI, liaison	Cellules du myocarde
Calcitonine	Humain	AMPc, liaison	HEK 293
Cannabinoïde CB1	Humain	AMPc, MAPK	CHO
Dopamine D_{1B}	Rat	AMPc	HEK 293
Glutamate métabotropique	Rat	PLC	HEK 293, LLC-PK1
Histamine H2	Rat	AMPc	CHO
δ-Opioïde	Rat	AMPc	HEK 293
Prostaglandine EP3	Souris	AMPc	CHO
Hormone de libération de la thyréotropine	Souris	PKC	COS-1, MDCK, GH4C1

Tableau 10 : Exemples de récepteurs couplés aux protéines G qui à l'état natif possèdent une activité constitutive élevée (d'après Arvanitakis *et al.*, 1998; Pauwels et Wurch, 1998).

Les méthodes d'étude employées sont : AMPc, le dosage de l'accumulation d'AMPc ou de l'activité de l'adénylate cyclase; physiologie, la mesure de l'activité cardiaque; Hydrolyse PI, dosage de l'hydrolyse des phosphatidylinostiol; liaison, mesure de la liaison de ligands; MAPK, dosage de l'activité des MAPK (mitogen-activated protein kinase); PLC, dosage de la phospholipase C et PKC, dosage de l'activité de la Protéine Kinase C.

L'analyse des récepteurs d'anguille montre que le récepteur D_{1C} semble également avoir une faible activité intrinsèque. Toutefois ces différences d'activité sont difficiles à détecter à l'aide des dosages d'accumulation de l'AMPc. Si le rôle de la troisième boucle intracytoplasmique semble évident, il était étonnant de ne pas avoir observé que la région C-terminale du récepteur ne joue pas un rôle plus important. La construction de chimères entre

les sous-types D_{1A}, D_{1B} et D_{1C} du xénope a permis d'approfondir cette hypothèse (Sugamori *et al.*, 1998b). La substitution a lieu après la tyrosine 345 et montre effectivement des modulations de l'activité du récepteur D_{1B}. Ainsi la substitution chez le D_{1B} de la région C-terminale par celle du D_{1A} annule l'effet agoniste partiel de certaines molécules comme le NNC 01-0012 ou le SKF-38393. De même l'échange avec la région C-terminale du D_{1C} entraîne une augmentation de l'accumulation d'AMPc sans modifier les caractéristiques de liaison ou d'activité constitutive. Ces résultats indiquent que la région C-terminale est certainement aussi responsable de la modulation des actions de la dopamine en fonction de la nature des sous-types du récepteur D_1.

V. Régulation cellulaire des récepteurs D_1

Les multiples réponses observées après l'activation des récepteurs impliquent une importante compartimentation et organisation temporelle de la cellule pour séparer et réguler tous ces phénomènes. La régulation de la fonction des récepteurs est un des aspects majeurs de leur physiologie. De cette régulation dépend l'adaptation de la cellule et de l'organisme aux conditions de l'environnement. La principale de ces régulations est la désensibilisation qui entraîne le découplage du récepteur de ses voies de transduction habituelles.

V.A. La désensibilisation des récepteurs D_1

La désensibilisation est une des propriétés les plus importantes du fonctionnement des récepteurs couplés aux protéines G. Son implication dans la baisse d'efficacité des traitements de certaines maladies comme la maladie de Parkinson ou la schizophrénie, fait de ce phénomène une voie de recherche importante pour la mise au point de médicaments ayant une demi-vie adaptée aux contraintes de la désensibilisation des récepteurs (Blanchet *et al.*, 1996; Imperato *et al.*, 1994). Par exemple, l'agoniste sélectif D_1, A-77636, induit une tolérance rapide *in vivo* à cause de son action prolongée et donc de la désensibilisation des récepteurs D_1, même lorsque l'agoniste est retiré du milieu (Lin *et al.*, 1996). La majeure partie des phénomènes détaillés ici a été décrite pour le récepteur $ß_2$-adrénergique. Toutefois, les nombreuses ressemblances de fonction entre ce récepteur et ceux de la classe D_1 (activation de la cyclase, structures proches,…) laissent penser que les mécanismes mis en jeu sont probablement semblables.

La stimulation prolongée d'une cellule par un transmetteur extracellulaire tel que la dopamine, entraîne au cours du temps une diminution de la sensibilité de la cellule à cette molécule. Ce phénomène est appelé désensibilisation et son mécanisme dépend principalement de la régulation de l'activité des récepteurs. Dans la cellule, l'activation prolongée par un

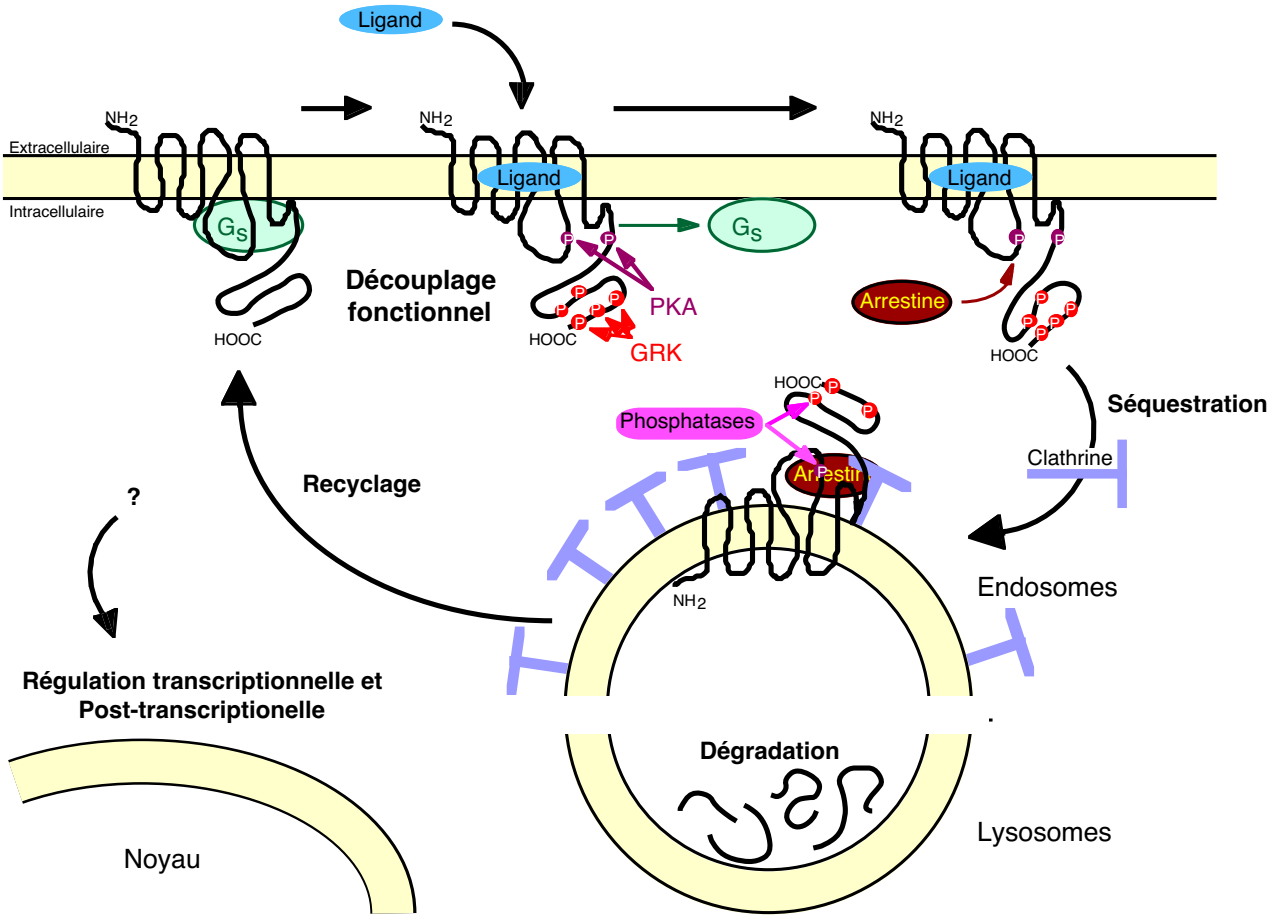


Figure 18 : Désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G.

Quand le ligand se lie sur le récepteur, il active les protéines G hétérotrimèriques. La protéine kinase A (PKA) et les protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) phosphorylent le récepteur. A ce moment, le récepteur est fonctionnellement découplé des protéines G et son affinité augmente pour les protéines arrestines. La fixation de l'arrestine sur le récepteur empêche toute nouvelle activation d'autres protéines G. En outre l'arrestine est capable de se lier avec la clathrine pour permettre l'endocytose du récepteur. Dans les endosomes, les phosphatases garantissent le recyclage du récepteur pour autoriser son retour à la membrane, mais il peut aussi être dirigé vers les lysosomes. A plus long terme, la régulation peut aussi intervenir à l'échelle des phénomènes de transcription.

agoniste se traduit par une diminution de l'affinité du récepteur pour son ligand, une baisse de son couplage aux protéines G et une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (Hausdorff *et al.*, 1990). Ces événements sont distincts dans le temps et dans l'espace (Figure 18, Ng *et al.*, 1995). Certaines analyses pharmacologiques avaient déjà pu mettre en évidence l'existence de deux étapes distinctes lors de la désensibilisation mesurée par la modification de l'affinité apparente du complexe récepteur/agoniste (Homburger *et al.*, 1980). Ces résultats étaient les premiers éléments pour penser qu'il n'y avait pas de relation directe entre le découplage de l'adénylate cyclase et l'endocytose du récepteur, ou du moins sa capacité à ne plus être accessible à la liaison d'un ligand radioactif.

On parle de désensibilisation à court terme pour désigner les mécanismes qui interviennent rapidement (moins de 30 minutes) pour atténuer l'activité du récepteur. Deux phénomènes peuvent être distingués (Tableau 11). Le premier entraîne une baisse de l'affinité pour le ligand dépendant du départ de la protéine G, puis lui succède une phosphorylation du récepteur par les protéines kinase A ou C, maintenant ainsi le récepteur dans son état de faible affinité pour l'agoniste. Cette désensibilisation dite "hétérologue" n'est pas spécifique du couple ligand/récepteur mais peut intéresser tous les récepteurs de la cellule. Au contraire, le second phénomène, la désensibilisation "homologue", dépend strictement de la présence de l'agoniste. Elle provoque le découplage durable des protéines G du récepteur en deux étapes. Tout d'abord la fixation du ligand sur le récepteur provoque sa phosphorylation en C-terminal sur des sérine et thréonine par des kinases spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G (GRK, Benovic *et al*., 1986). Une fois que le récepteur est phosphorylé, son affinité augmente pour les protéines arrestines, qui viennent se placer au voisinage de la 3ème boucle intra-cytoplasmique empêchant ainsi de nouveaux couplages récepteur/protéine G (Lohse *et al*., 1990).

Désensibilisation homologue	Désensibilisation hétérologue
Phosphorylation rapide (secondes)	Phosphorylation plus lente (minutes)
Dépends de la présence du ligand sur le récepteur	Apparaît aussi en l'absence d'occupation du récepteur
En présence de fortes concentrations d'agonistes	En présence de faibles concentrations d'agoniste
Intervention de kinases spécifiques (GRK)	Intervention des kinases régulées par les seconds messagers (PKA et PKC)

Tableau 11 : Comparaison entre les deux processus homologues et hétérologues de la désensibilisation (d'après Tobin, 1997).

Par la suite, la désensibilisation à long terme qualifie les mécanismes intervenant après 1 heure de contact avec l'agoniste. Plusieurs événements ont été observés. En premier lieu, les récepteurs sont internalisés par endocytose. Ils peuvent alors être soit recyclés après déphosphorylation par des phosphatases, soit dégradés dans les lysosomes, ce qui régule leur nombre à la surface cellulaire. L'effet de ces phosphatases n'a été que très peu analysé et il a été découvert d'abord chez la drosophile (Vinos *et al*., 1997). Beaucoup plus tard, si la présence de l'agoniste persiste, on observe une diminution du taux des ARNm codant pour le récepteur, ce qui tend à réduire sa biosynthèse (Valiquette *et al*., 1990). Ces mécanismes de régulation à long terme des récepteurs couplés aux protéines G restent toutefois mal connus, et il est probable qu'ils ne représentent pas un mécanisme de régulation majeur pour des récepteurs comme les récepteurs D_1 et ß-adrénergiques.

V.A.1. Les observations préliminaires

Les premières analyses de la désensibilisation des récepteurs de la dopamine ont été effectuées sans distinguer les sous-types. L'incubation de tranche de striatum pendant 30 minutes avec de la dopamine, de l'apomorphine ou du SKF-38393 (10μM) entraîne une diminution de 50 à 60% de l'activité de l'adénylate cyclase (Memo *et al.*, 1982). Cette diminution est bien spécifique des récepteurs D_1 car elle est inhibée par le SCH-23390. Les injections d'amphétamine capables de libérer de la dopamine des terminaisons neuronales ont permis d'observer *in vivo* une diminution du couplage des récepteurs D_1 à l'adénylate cyclase (Roseboom et Gnegy, 1989). Toutefois, aucune baisse de la quantité de récepteurs (Bmax) n'est alors observée par la liaison de ligand radioactif. Des analyses effectuées sur les récepteurs de la dopamine du rein indiquent que ces phénomènes de désensibilisation interviennent également dans les types cellulaires du tubule proximal du rein d'oppossum (Bates *et al.*, 1991). Ainsi, après 15 minutes de stimulation par la dopamine (10μM) les récepteurs sont capables de perdre la moitié de l'activité de l'adénylate cyclase, mais cette diminution ne dépasse pas 63% après 4 heures. L'analyse par liaison de SCH-23390 radiomarqué montre que la baisse du nombre de récepteurs n'intervient qu'après 30 minutes et n'atteint pas 42% de réduction au bout de 4 heures. Cependant l'absence de fractionnement cellulaire dans toutes ces expériences, rend difficilement interprétables toutes les expériences de liaison de récepteurs. Sans séparer les récepteurs de la membrane plasmique de ceux des compartiments intracellulaire, il se peut que les diminutions observées ne soient pas dues à une internalisation mais seulement à un chagement de conformation interférant sur les valeurs de Bmax. Le développement d'outils moléculaires plus précis et l'identification des différents sous-types du récepteur D_1 permet d'affiner les analyses et de préciser chaque étape importante du phénomène de désensibilisation.

V.A.2. La première étape : le découpage fonctionnel

La phosphorylation du récepteur intervient dès la fixation du ligand (Figure 18). Deux classes principales de protéines kinases sont impliquées dans ce phénomène : la PKA et les GRK. La PKA est, semble-t-il, généralement utilisée dans les mécanismes de phosphorylation sans spécificité pour une classe de récepteurs. Par contre les GRK sont plus spécifiques de l'interaction ligand/récepteur.

a. Les protéines kinases non spécifiques

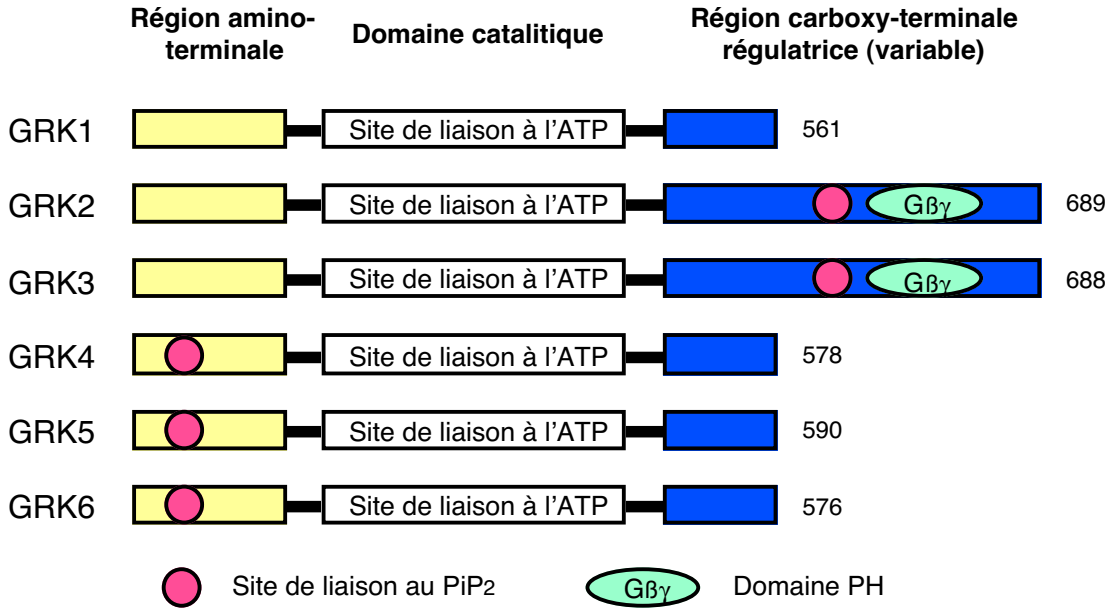
L'implication de kinases dans les phénomènes de désensibilisation hétérologue a été observée pour les récepteurs D_1 dans la rétine de bœuf (Ackerman et Gnegy, 1990). Ainsi, la dépolarisation due au potassium est capable de désensibiliser les récepteurs D_1 en découplant les récepteurs des voies de signalisation. Cet effet est mimé par des produits augmentant le taux d'AMPc dans les neurones de la rétine. L'analyse du rôle de la PKA dans la désensibilisation du récepteur D_{1A} a été effectuée précisément par expression du récepteur dans des lignées mutantes CHO exprimant différents taux de PKA (Sibley *et al.*, 1998). Dans les lignées cellulaires contenant le moins d'activité PKA, la désensibilisation se produit très lentement ce qui semble indiquer un rôle majeur de cette enzyme dans la régulation du récepteur. De plus, la PKA intervient aussi bien dans le découplage rapide que dans la régulation à long terme, impliquant la diminution du nombre de récepteurs. A l'aide de mutants des sites possibles de phosphorylation par la PKA (Thr 135, Ser 229, Thr 268, Ser 380), ces mêmes auteurs montrent que la phosphorylation du récepteur par la PKA permet d'augmenter la vitesse de la désensibilisation. En effet, le temps nécessaire pour atteindre la désensibilisation maximale est de 3 heures pour le mutant contre 1 heure pour le récepteur sauvage. La mutagenèse dirigée de la thréonine 268 du récepteur D_{1A} de rat confirme qu'elle est nécessaire à la cinétique naturelle de la désensibilisation (Jiang et Sibley, 1999). Lorsque cet acide aminé est muté en valine la baisse d'accumulation d'AMPc est plus lente. Ainsi au bout d'1 heure quand le récepteur sauvage est désensibilisé de 80% de la réponse maximale le mutant ne l'est que de 20%. Toutefois la désensibilisation maximale est toujours obtenue ce qui veut dire que d'autres types de mécanismes entrent en jeu. La mutation simultanée des quatre sites potentiels de phosphorylation par la PKA n'apporte rien de plus que le mutant Thr 268 seul, sans modification ni des capacités de liaison des agonistes ni de l'activation de l'adénylate cyclase (Figure 15). *In vitro*, la PKA est capable de phosphoryler la région C-terminale du récepteur D_{1A} humain alors que la PKC n'a aucune action (Zamanillo *et al.*, 1995). Par contre, aucune de ces deux kinases n'est capable de phosphoryler *in vitro* la région C-terminale du récepteur D_{1B}. La mutagenèse de la sérine 380 en alanine dans le récepteur D_{1A} abolit cette phosphorylation. La diversité des observations effectuées après mutagenèse rend très incertain l'emploi de tels outils pour l'analyse des mécanismes physiologiques précis.

L'analyse de l'expression stable du récepteur D_1 dans des cellules de rein d'opossum a été faite en parallèle avec l'expression stable de l'ADNc d'une phosphodiestérase (rPDE3) afin d'étudier l'incidence de l'accumulation d'AMPc sur la désensibilisation de ce récepteur (Bates *et al.*, 1993). Après un prétraitement d'une heure avec 1μM de dopamine, la capacité d'accumulation d'AMPc n'est modifiée dans aucune des lignées cellulaires exprimant les deux

transcrits exogènes (récepteur et phosphodiestérase) et reste proche de celle des cellules n'exprimant que le récepteur D_1 soit environ 40 à 50% de diminution. Par contre, la diminution du nombre de récepteurs, mesuré par liaison, est modifiée et elle même supprimée dans certains clones. En revanche, sans la surexpression de la phosphodiestérase, cette diminution est de 45%. Ces expériences indiquent que si l'accumulation d'AMPc ne semble pas influencer le découplage fonctionnel, par contre, elle intervient dans l'internalisation du récepteur. Cette modification pourrait provenir d'un changement dans l'activité de la PKA, très diminuée dans les lignées exprimant la phosphodiestérase. En conclusion, si le rôle de la PKA est important dans la cinétique de la désensibilisation, ce n'est pas la seule kinase mise en jeu.

b. Les kinases associées aux récepteurs couplés aux protéines G (GRK)

Le rôle des GRK a été montré par un certain nombre de moyens comme la surexpression, ou l'utilisation d'anticorps inhibant leur fonction (Figure 19). La surexpression de GRK2 augmente la désensibilisation du récepteur $ß_2$-adrénergique (Pippig *et al.*, 1993), alors que la surexpression d'un dominant négatif l'atténue (Kong *et al.*, 1994). Les GRK sont spécifiques des récepteurs ayant fixé un agoniste, mais elles ne possèdent pas de profils distincts de reconnaissance des récepteurs (pour revue sur les GRK voir Inglese *et al.*, 1993; Pitcher *et al.*, 1998a et Tableau 12). Les sensibilités des récepteurs aux différentes GRK varient selon les familles de récepteurs (pour revue voir Carman et Benovic, 1998). Ainsi, les sous-types de récepteurs adénosine (A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3) et α-adrénergiques (α_{1B}, α_{2A}, α_{2B}, α_2) sont sensibles à GRK2 ou GRK3 sans différences visibles. Plus précisément les GRK2, 5 et 6 sont capables de phosphoryler le récepteur α_{2A} mais pas le récepteur α_{2C} (Jewell-Motz et Liggett, 1996). Des expériences similaires sur le récepteur α_{2B} montrent que les GRK2, 3 et 6 peuvent phosphoryler le récepteur en présence du ligand alors que la GRK5 ne le permet pas (Diviani *et al.*, 1996). Dans tous les cas, les sous-types GRK2 et 3 semblent les plus utilisées, ce qui exclut une quelconque spécificité de ces protéines dans la régulation différentielle, récepteur spécifique, de la désensibilisation. De plus, dans des expériences de sauvetage d'un mutant du récepteur $ß_2$-adrénergique incapable d'être séquestré, la surpexpression de toutes les GRK sauf GRK1 permet de récupérer un phénotype normal (Ménard *et al.*, 1996). Il ne semble pas y avoir non plus de spécificité entre GRK2 et les différents sous-types de récepteur muscarinique humain M_1 à M_5. Par contre les GRK4 et 5 ne modulent que M_2 et GRK6 est visiblement sans effet sur la séquestration de ces récepteurs (Tsuga *et al.*, 1998). L'utilisation d'anticorps capables d'inhiber spécifiquement l'action des GRK2/3 ou GRK4/5/6 permet d'approcher d'une autre manière la spécificité GRK/récepteurs (Opperman *et al.*, 1996). Dans des myocytes de lapin, l'utilisation d'anticorps contre les protéines GRK2/3 inhibe 77% de la phosphorylation des récepteurs



Nom	kDa	Association à la membrane	Localisation (hybridation *in situ*)	Particularité
GRK1 (RK)	63	Farnésylation	Rétine	Forte autophosphorylation
GRK2 (ßARK1)	79	Gßγ, PiP_2	Ubiquiste (l, sn>>c>p>r)	Domaine PH
GRK3 (ßARK2)	80	Gßγ, PiP_2	Ubiquiste (sn>ra>c, p, r)	Domaine PH
GRK4 (IT-11)	66	Palmitoylation	Testicules	4 variants d'épissage
GRK5	68	?	Ubiquiste (c, pl, p>m>sn, f, pa>r)	Forte autophosphorylation
GRK6	66	Palmitoylation	Ubiquiste (sn, m> pa>c, p, r, pl>f)	2 gènes

Figure 19 : Caractéristiques des protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK).

Pour chacune des six GRK sont donnés le nom commun, la taille en kDa, la localisation et les particularités de chacune. Au-dessus du tableau, la structure de chacune des GRK est schématisée. RK, Rhodopsin Kinase; PH, Pleckstrin Homology. Localisation : r, rein; p, poumon; c, cœur; l, leucocytes; sn, cerveau; ra, rate; pl, placenta; pa, pancreas; m, muscles squeletiques et f, foie.

$ß_2$-adrénergiques induite par l'isoprotérénol, alors que les anticorps anti-GRK4/5/6 sont sans effets. Ces interactions différentielles avec les récepteurs ont aussi été observées pour les récepteurs D_2 (Ito *et al.*, 1999). Lorsque l'on exprime les récepteurs D_2 dans les cellules COS-7, on n'observe pas de séquestration, alors que la coexpression avec GRK2 entraîne une séquestration de 50% du récepteur D_{2S} et de 36% du récepteur D_{2L} après 2 heures de traitement à la dopamine (100μM). En présence de GRK5, la séquestration est aussi facilitée, mais de seulement 36% pour le récepteur D_{2S}. Ce phénomène est sensible à l'hypertonicité du milieu ce qui est caractéristique des mécanismes d'internalisation impliquant la clathrine. Au vu de tous ces résultats, il semble donc que les GRK jouent un rôle précis à une étape particulière de la désensibilisation plutôt qu'elles possèdent une spécificité d'association à un récepteur particulier.

Récepteur	GRK	Techniques	Méthodes de mesure
Adénosine A_1	2	*In vitro*	Phosphorylation *In vitro*
Adénosine A_{2A}	2	DN	Désensibilisation
Adénosine A_{2B}	2	DN	Désensibilisation
Adénosine A_3	2	*In vitro*	Phosphorylation *In vitro*
α_{1B}-adrénergique	2,3>6>5	SE/DN	Phosphorylation/Désensibilisation
α_2-adrénergique	2,3>4,5,6	Anticorps	Phosphorylation/Désensibilisation
α_{2A}-adrénergique	2,3	SE	Phosphorylation
α_{2B}-adrénergique	2,3>>5,6	SE	Phosphorylation
$ß_1$-adrénergique	1,2,3,5	SE/DN	Phosphorylation/Désensibilisation
$ß_2$-adrénergique	2,3>4,5,6	Anticorps/AS/DN/SE Transgénique	Phosphorylation/Désensibilisation Physiologie
Dopamine D_{1A}	5>2,3	SE	Phosphorylation
Endothéline A	2>5,6	SE	Phosphorylation/Désensibilisation
Endothéline B	2>5,6	SE	Phosphorylation/Désensibilisation
m_2 Acétylcholine	2,3	SE/DN	Phosphorylation/Désensibilisation Séquestration
m_3 Acétylcholine	2,3>>5,6	*In vitro*	Phosphorylation *In vitro*
δ-Opioïde	3	SE	Désensibilisation
κ-Opioïde	2,5	SE/DN	Phosphorylation/Désensibilisation
μ-Opioïde	3	SE	Désensibilisation
Substance P	2,3	*In vitro*	Phosphorylation *In vitro*

Tableau 12 : Les récepteurs substrats des kinases des récepteurs couplés aux protéines G, GRK (d'après Carman et Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998a).

Analyse de la spécificité des GRK pour différents récepteurs couplés aux protéines G. Les techniques d'analyse sont : Anticorps, l'utilisation d'anticorps inhibiteurs spécifiques des GRK; AS, construction d'oligonucléotides antisens des GRK; DN, surexpression d'un mutant spécifique dominant négatif, *In vitro*, dosage dans des cellules reconstituées avec des GRK purifiées; SE, surexpression de GRK spécifiques et Transgénique, surexpression transgénique ou inactivation des GRK. Les méthodes d'analyses employées sont : Phosphorylation, mesure de la phosphorylation directe du récepteur dans les cellules, Phosphorylation *In vitro*, même méthode mais en dehors de la cellule; Physiologie, mesure du fonctionnement cardiaque; Séquestration, étude de l'internalisation du récepteur et Désensibilisation, mesure de la désensibilisation spécifique de chaque récepteur.

La phosphorylation du récepteur D_{1A} de rat apparaît dès les premières secondes d'incubation avec l'agoniste et devient maximale après 5 minutes (Tiberi *et al.*, 1996). La

coexpression des protéines GRK2, 3 et 5 ne fait qu'augmenter cette phosphorylation. Dans ce cas, cette phosphorylation n'intervient que sur les résidus sérines du récepteur (Tiberi *et al.*, 1996). Cette façon de réguler le fonctionnement des récepteurs n'est pas habituelle. En effet, on trouve communément des modifications dans le taux de phosphorylation des récepteurs comme dans le cas des récepteurs ß-adrénergiques (Freedman *et al.*, 1995; Kunapuli *et al.*, 1994; Pei *et al.*, 1994b). Dans le cas du récepteur D_{1A}, le même taux de phosphorylation des récepteurs est obtenu quelle que soit la protéine GRK surexprimée, mais il existe des différences dans les conséquences biologiques de la désensibilisation en fonction de la nature des GRK. Ainsi, seule la présence de GRK5 permet de réduire de façon importante le niveau maximal de l'activation de l'adénylate cyclase. Ces résultats suggèrent que s'il n'y a pas de spécificité de phosphorylation parmi les GRK, elles peuvent produire des profils de désensibilisation différents en interagissant avec la réserve de protéines présente dans la cellule. Le contenu de chaque neurone et la région où il s'exprime peut donc influer sur la réponse de la cellule. Ainsi les ARNm des GRK2, 3 et 5 sont distribuésde façon différentielle dans le cerveau. Dans plusieurs aires cérébrales, les protéines GRK2 et 3 sont présentes en même temps que les récepteurs D_{1A} (Arriza *et al.*, 1992). De plus, la protéine GRK5 est exprimée dans le cortex et la rétine, deux zones où l'on retrouve également les récepteurs D_{1A} (Didsbury *et al.*, 1991; Premont *et al.*, 1994). Des différences de désensibilisation pour les récepteurs D_1 ont d'ailleurs été montrées dans ces régions, avec une désensibilisation plus forte dans la rétine que dans le cortex (Ofori *et al.*, 1993), ce qui pourrait s'expliquer par ces différences dans la composition des voies de régulation. Toutefois, la présence exclusive des récepteurs D_1 dans la rétine, alors que les récepteurs D_1 et D_2 sont exprimés dans le striatum est probablement la raison d'une capacité de stimulation de l'adénylate cyclase par la dopamine plus forte dans la rétine que dans le striatum.

Les sites de phosphorylation des récepteurs D_1 par les GRK n'ont pas encore été identifiés, pour plusieurs raisons. Bien que des déductions aient été faites à partir des études de mutagenèse, l'identification claire de ces sites nécessite la purification et l'analyse biochimique des récepteurs (Diviani *et al.*, 1997; Fredericks *et al.*, 1996). Or, les récepteurs couplés aux protéines G sont particulièrement hydrophobes et souvent exprimés à de faibles taux, ce qui les rend très difficile à purifier. De plus, contrairement aux kinases PKA ou PKC, il est impossible d'obtenir les séquences “consensus” par simple comparaison. Enfin, les analyses *in vitro* ont bien montré l'existence de sites de phosphorylation potentiels, mais l'analyse *in vivo* indique que, selon le stimulus, ces sites de phosphorylation sont différents et surtout, différents des prédictions (Böhm *et al.*, 1997). La phosphorylation des récepteurs par les GRK nécessite l'association de ces kinases avec les sous-unités ßγ des protéines G (Carman *et al.*, 2000) et plus particulièrement avec le domaine PH des sous-unités ß des protéines G (pour revue voir Daaka *et al.*, 1997; Inglese *et al.*, 1995). Toutefois, certaines expériences contredisent ces observations et

montrent au contraire que lorsque l'on supprime l'isoprénylation de la sous-unité γ, ce qui induit la redistribution de ßγ dans le cytoplasme, on ne modifie pas la localisation de GRK2 (Murga *et al.*, 1997). La protéine GRK2 est également capable de phosphoryler la tubuline ce qui indiquerait que cette kinase appartient à un complexe de signalisation qui n'est pas uniquement limité à la diminution du couplage des récepteurs couplés aux protéines G mais qui est associé à la signalisation vers le cytosquelette (Pitcher *et al.*, 1998b). Approximativement 10% des récepteurs couplés aux protéines G contiennent un motif PDZ (Tableau 6) que l'on retrouve aussi dans GRK3 et GRK6. La découverte de toutes ces interactions permet d'associer les GRK au "transducisome" capable de rassembler tous les acteurs de la régulation du signal.

c. Quelle est la part de toutes ces kinases régulatrices dans la désensibilisation ?

Les interactions précises entre les voies de régulation semblent encore une fois très dépendantes des systèmes cellulaires dans lesquels elles sont analysées. Ainsi, dans des cellules musculaires ou dans la lignée CHO, le récepteur $ß_2$-adrénergique est principalement désensibilisé par GRK2. Dans des ostéosarcomes de rat, c'est plutôt la PKA qui joue ce rôle. Dans des carcinomes épidermaux humains, les deux systèmes interviennent à égalité (Shih et Malbon, 1994). De même, des expériences effectuées sur le récepteur $ß_2$-adrénergique montrent que ces deux phénomènes de phosphorylation ont lieu lorsque le récepteur est activé par son ligand naturel dans une lignée fibroblastique de hamster chinois (CHW, Hausdorff *et al.*, 1989). L'utilisation de différents mutant du récepteur dont les sites de phosphorylation ont été supprimés montre, qu'à de faibles concentrations (nanomolaire) de ligand, seule la PKA peut phosphoryler le récepteur alors qu'à de plus fortes concentrations (micromolaire) les deux types de kinases PKA et GRK agissent ensemble pour désensibiliser le récepteur.

Cette étape de phosphorylation semble l'évènement majeur qui conditionne l'efficacité de la désensibilisation. Les expériences effectuées sur des cultures cellulaires permettent de s'affranchir de la multiplicité d'expression des sous-types que l'on rencontre lors de l'utilisation de cultures primaires ou de tranches de cerveau. Dans le cas des récepteurs ß-adrénergiques, quelques travaux ont suggéré que les sous-types de récepteur $ß_1$, $ß_2$ et $ß_3$ pouvaient être distingués sur la base de leurs propriétés de désensibilisation. Transfectés dans le même type cellulaire, les réponses à l'activation du récepteur $ß_2$ disparaissent plus vite et de façon plus intense que celles du récepteur $ß_1$. Le récepteur $ß_3$, est quant à lui, peu affecté par la désensibilisation. Ces propriétés fonctionnelles sont très bien corrélées avec le nombre et le type de motifs de séquences modifiés par phosphorylation (Marullo *et al.*, 1995). Pour les récepteurs de la dopamine, il est observé que la désensibilisation des récepteurs D_1 intervient dans les

30 premières minutes après la fixation d'un agoniste (Balmforth *et al.*, 1990; Barton et Sibley, 1990). Une inactivation fonctionnelle est aussi observée pour le récepteur D_2 dans des cellules de rétinoblastome Y-79 où le découplage fonctionnel et la baisse de la liaison spécifique du récepteur sont observés après traitement par un agoniste (Barton *et al.*, 1991). En phosphorylant le récepteur, les protéines kinases modifient l'affinité de la région C-terminale du récepteur. Ainsi en retour, le récepteur passe dans un état de basse affinité pour la protéine G ce qui empêche toute activation par de nouvelles protéines G. De plus, l'affinité du récepteur augmente pour certaines autres protéines, dont les arrestines, qui stabilisent le récepteur dans cet état de basse affinité et facilite son internalisation (Ferguson *et al.*, 1996).

V.A.3. L'internalisation des récepteurs

Les expériences effectuées avec les sous-types D_{1A} et D_{1B} montrent qu'après le découplage des récepteurs et des protéines G, une étape d'internalisation a lieu (pour une revue sur l'endocytose voir Cremona et De Camilli, 1997; Mukherjee *et al.*, 1997). Ce phénomène est distinct dans le temps et dans l'espace de celui de la phosphorylation du récepteur comme le montre l'utilisation d'agents bloquants l'internalisation tels qu'un milieu riche en sucrose ou l'utilisation de concanavaline A (Ariano *et al.*, 1997a; Jarvie *et al.*, 1993; Ng *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 1995). Dans tous les cas, ces agents bloquent l'endocytose sans empêcher la désensibilisation des récepteurs. Des études *in vivo* sur les neurones striataux de rat montrent que ce processus de désensibilisation a lieu pour les récepteurs D_1 après injection d'amphétamine (Dumartin *et al.*, 1998). Ainsi, après une injection intrapéritonéale d'un agoniste (SKF-82958), les récepteurs D_{1A} dans le striatum subissent une importante redistribution intracellulaire. Le marquage membranaire diminue, avec une intensification du regroupement intracytoplasmique au niveau du corps cellulaire et des dendrites. Les vésicules marquées ressemblent à des endosomes et sont en plus grand nombre entre 20 et 40 minutes après l'injection. Aucun marquage ne semble associé aux lysosomes ni à l'appareil de Golgi ou au réticulum endoplasmique. L'injection du produit directement dans le striatum ne modifie pas ces phénomènes, et permet simplement de préciser la cinétique de leur apparition. Ainsi l'internalisation apparaît dès 4 minutes après l'injection et reste intense de 10 minutes à 1 heure après celle-ci (Dumartin *et al.*, 1998), ce qui confirme les cinétiques observées *in vitro*.

a. L'internalisation par les vésicules recouvertes de clathrine

La purification de vésicules recouvertes d'un manteau de clathrine, préparées à partir de striatum de bœuf, indique que les récepteurs D_1 et D_2 sont localisés avec les éléments de leurs

cascades de transduction : protéines G et adénylate cyclase (Ozaki *et al.*, 1994). Ces purifications montrent que l'internalisation de ces récepteurs se produit dans les vésicules recouvertes de clathrine. Cette endocytose pourrait être favorisée par une interaction directe entre l'arrestine et la clathrine (Goodman *et al.*, 1996). En outre, la transfection conjointe de mutants dominants négatifs de la dynamine, protéine nécessaire à la formation de la vésicule, et d'un dominant négatif de l'arrestine bloque l'internalisation des récepteurs et leur régulation (Gagnon *et al.*, 1998). Toutes ces expériences montrent que l'arrestine est impliquée dans une étape du processus d'internalisation. De plus, l'arrestine s'associe avec la protéine adaptatrice AP2 pour permettre l'assemblage de nouvelles vésicules recouvertes de clathrine (Laporte *et al.*, 2000). C'est lors de la purification des GRK, que la perte de la capacité de désensibilisation, au cours des étapes de purification, a laissé penser à l'existence d'un cofacteur (Benovic *et al.*, 1987). La fonction de ce cofacteur, l'arrestine, a été montrée, comme pour les GRK, par des expériences de surexpression (Tableau 13). Les arrestines ont un rôle important non seulement pour l'internalisation mais aussi pour le recyclage correct des récepteurs, puisque la surexpression de la ß-arrestine 2 est capable de compenser la mutation du récepteur $ß_2$-adrénergique incapable de se resensibiliser (Zhang *et al.*, 1997). La ß-arrestine se trouve à la membrane sous une forme phosphorylée qui lui permet d'intervenir dans la désensibilisation et le découplage. Mais elle a besoin d'être déphosphorylée pour permettre l'endocytose des récepteurs (Lin *et al.*, 1997). Les phosphinositols sont fondamentaux pour transférer le complexe recepteur/arrestine vers les puits couverts de clathrine (Gaidarov *et al.*, 1999), et la séquestration des sous-unités ßγ des protéines G inhibe l'endocytose des récepteurs dans les vésicules à clathrine (Lin *et al.*, 1998). Il semblerait donc que l'endocytose des récepteurs nécessite un mécanisme qui coordonne l'interaction entre plusieurs protéines : la dynamine, la clathrine et les protéines G pour permettre la fermeture de la vésicule d'endocytose (Achiriloaie *et al.*, 1999). L'endocytose du récepteur $ß_2$-adrénergique nécessite la phosphorylation des tyrosines présentes dans la région C-terminale du récepteur (Valiquette *et al.*, 1990). En effet, la mutation de deux tyrosines en C-terminal réduit de façon importante la diminution du nombre de récepteurs accessibles à la liaison radioactive.

Nom	Taille (Acides aminés)	Localisation	Substrat	Régulation
Arrestine des cônes	404	Rétine	Rhopsine, $ß_2$AR et m_2AChR	PKC et Calmoduline
Arrestine des batonnets	388	Rétine	?	?
ß-Arrestine 1	418	Ubiquiste	$ß_1$, $ß_2$, α_{1B} récepteurs adrénergiques, m_2AChR et rhodopsine	?
ß-Arrestine 2	420	Ubiquiste	$ß_1$, $ß_2$, α_{1B} récepteurs adrénergiques, m_2AChR, récepteurs des odeurs et rhodopsine	?

Tableau 13 : Caractéristiques des membres de la famille des arrestines.

La localisation a été effectuée par hybridation *in situ*. Abréviations : AR, récepteurs adrénergiques; AChR, récepteurs de l'acétylcholine; PKC, protéine kinase C.

b. Implication de la voie caveolaire

Les mécanismes d'internalisation des récepteurs par les vésicules à cathrine ont été sujets à beaucoup de controverses. Si les récepteurs $ß_2$-adrénergiques voient leur séquestration diminuée en présence d'un mutant dominant négatif de la dynamine, ce n'est pas le cas des récepteurs AT_{1A} de l'angiotensine II (Zhang *et al.*, 1996). Ces effets sont mesurés par la diminution de la quantité de récepteurs accessibles aux anticorps à la surface de la cellule. De plus, l'utilisation d'un mutant dominant négatif de la ß-arrestine montre la même différence puisque seule l'internalisation des récepteurs $ß_2$-adrénergiques est affectée. Si une majorité des études sur l'internalisation décrit les vésicules recouvertes de clathrine comme la voie principale d'endocytose durant la désensibilisation, d'autres observations sont contradictoires. Après traitement à l'isoprotérénol sur des cellules de carcinomes (A431), les récepteurs $ß_2$-adrénergiques sont observés en microscopie électronique, dans des vésicules d'endocytose sans clathrine, ce qui suggère une internalisation via les caveolae (Raposo *et al.*, 1989). Ces analyses sont contradictoires avec les travaux de l'équipe de von Zastrow qui montre que l'endocytose du récepteur $ß_2$ a bien lieu dans des vésicules à clathrine mais qui diffèrent fonctionnellement des vésicules classiques comme celles qui contiennent des récepteurs de la transférrine (Cao *et al.*, 1998). Plusieurs récepteurs couplés aux protéines G sont dirigés vers les caveolae, par semble-t-il, deux types de mécanismes (pour revue voir Anderson, 1998; Okamoto *et al.*, 1998). Après contact avec l'agoniste, les récepteurs comme le récepteur M_2 muscarinique de l'acétylcholine (Feron *et al.*, 1997), les récepteurs de la bradykinine (De Weerd et Leeb-Lundberg, 1997) ou de l'endothéline (Chun *et al.*, 1994) et les récepteurs ß-adrénergiques (Dupree *et al.*, 1993) se déplacent vers les caveolae, où ils retrouvent tout l'environnement nécessaire à la transduction du signal. Dans cette voie, les caveolines pourraient jouer un rôle

similaire à celui des protéines à domaine PDZ pour créer un “échafaudage” contenant tous les effecteurs nécessaires à la transduction rapide du signal (Figure 16). L'autre processus possible concerne les récepteurs qui sont déjà localisés dans les caveolae à l'état de repos. La liaison du ligand sur ces récepteurs s'effectue donc dans les caveolae où le récepteur est déjà asocié à son module de transduction, prêt à être activé efficacement. Ainsi, dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat, le récepteur A_1 est isolé dans les caveolae à 67% (Lasley *et al.*, 2000).

c. Quelle est la part relative de chacune de ces voies dans l'endocytose ?

Ces deux voies d'endocytose dans les vésicules à clathrine ou les caveolae sont observées pour les récepteurs ß-adrénergiques après la fixation du ligand, et ces deux mécanismes ont été analysés dans les mêmes cellules pour les récepteurs de la cholecystokinine de type A (Roettger *et al.*, 1995 et Figure 20). Dans ces travaux, la voie cavéolaire semble avoir un rôle dans la désensibilisation à court terme et le recyclage dans les endosomes proches de la membrane plasmique. Par contre, les puits recouverts de clathrine, semblent correspondre à la voie prédominante pour la désensibilisation à long terme qui nécessite un passage dans des endosomes tardifs et les lysosomes. Les analyses effectuées dans les cellules CHO pourraient indiquer que la voie des caveloae est plus particulièrement impliquée dans le recyclage rapide des récepteurs à la membrane, alors que la voie d'endocytose via la clathrine est impliquée plus particulièrement dans la régulation à long terme qui aboutit à la dégradation des récepteurs. Ces expériences effectuées en lignée stable sont assez convainquantes car elles comportent non seulement des observations en microscopie à fluorescence, mais aussi des observations en microscopie électronique. De plus, l'utilisation de sondes peptidiques fluorescentes et l'emploi de certains inhibiteurs de la voie de la clathrine permet d'avoir une bonne idée de la part respective de chacune des voies dans l'endocytose des récepteurs lors de la désensibilisation. Il semble donc qu'au maximum 40% des récepteurs soient capables d'emprunter la voie des caveolae. L'observation des mécanismes intervenant dans l'endocytose sur un seul type de neurone n'a pas permis de bien séparer les voies de la clathrine, des voies cavéolaires (Rankin *et al.*, 1999). La recherche par western blot et immunoprécipitation des acteurs de l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G a permis de détecter la protéine GRK2, une ß-arrestine, la clathrine et la dynamine. A l'aide du marqueur FM1-43 l'internalisation des récepteurs olfactifs est observée au bout de 45 minutes et le mécanisme semble dépendre de la clathrine. En effet, le traitement à l'acide okadaique qui active la voie caveolaire ne donne pas de résultats clairs. Il semble bien difficile aujourd'hui de comprendre l'intervention exacte des caveolae dans l'internalisation des récepteurs lors de la désensibilisation.

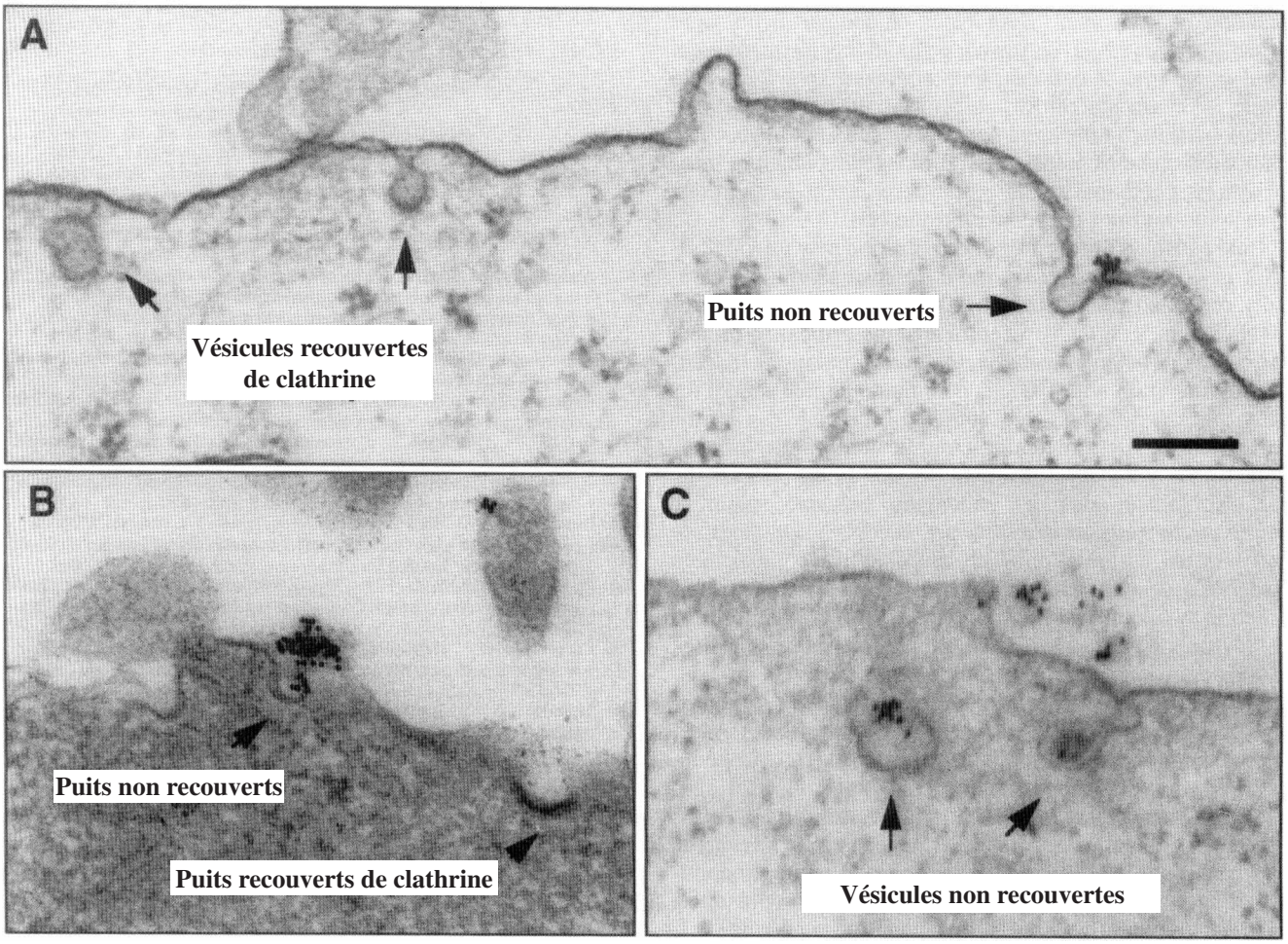


Figure 20 : Internalisation de la cholécystokinine (CCK) couplée à des billes d'or dans des cellules CHO exprimant de façon stable les récepteurs de la CCK (d'après Roettger *et al.*, 1995).

A. et **B.** Les cellules sont préincubées avec la CCK couplée aux billes d'or pendant une heure à 4°C puis réchauffées à 37°C avant l'observation au microscope électronique. **C.** Effet de l'inhibition de l'endocytose par la voie de la clathrine (par déplétion en potassium). Le marquage à l'or se retrouve exclusivement dans les puits non recouverts. La barre représente 200µm.

De nombreuses molécules de la signalisation sont localisées dans les puits membranaires caveolaires tels que les sous-unités α et ß des protéines G ou l'adénylate cyclase (Huang *et al.*, 1997). Ce qui semble indiquer que l'endocytose par ces vésicules faciliterait le couplage des récepteurs. De plus, une fois activée, la sous-unité G_α des protéines G reste agrégée à la membrane et ne se retrouve pas libérée dans le cytoplasme (Huang *et al.*, 1999). L'observation de cellules de neuroblastomes Neuro2A coexprimant les récepteurs D_{1A} et D_2 humain portant chacun des étiquettes différentes montre que si le récepteur D_1 se localise bien à la membrane, le récepteur D_2 se localise dans des vésicules et semble sujet à une endocytose constitutive (Vickery et von Zastrow, 1999). Après activation par la dopamine, l'internalisation, observée par marquage avec un anticorps sur des cellules intactes, s'effectue dans des vésicules différentes.

Cette particularité n'est pas unique aux cellules neuronales puisqu'on la retrouve dans les cellules HEK 293 exprimant les récepteurs de façon stable. L'internalisation est rapide dans les 10 minutes après stimulation par la dopamine et atteint 70% de la réserve de récepteurs par rapport à l'état de base avec moins de 5% d'internalisation sans activation. Par contre, on observe 25% d'internalisation continue pour le récepteur D_2. La cotransfection d'un mutant dominant négatif de la dynamine inhibe l'internalisation du récepteur D_{1A} mais pas celle du récepteur D_2. Cependant, des expériences récentes ont montré que les mutants dominant négatif de la dynamine utilisés jusqu'à maintenant n'inhibait pas complétement l'internalisation par les voies dépendantes de la clathrine (Werbonat *et al.*, 2000). En plus de cette différence d'internalisation D_{1A}/D_2, on ne remarque pas de colocalisation entre les récepteurs D_{1A} et D_2 dans les vésicules d'endocytose.

Des expériences du même type ont été conduites pour les récepteurs de l'angiotensine II. Après un traitement à l'angiotensine II, seul le sous-type AT_{1A} est internalisé alors que le sous-type AT_2 ne l'est pas ([Hein, 1997 #201Ces différences sont visibles dans une grande variété de types cellulaires (pour revue voir Hunyady, 1999). Enfin, des résultats similaires sont observés avec les sous-types de récepteur α_2-adrénergiques (Daunt *et al.*, 1997). Après activation par le ligand, le sous-type α_{2A} ne semble pas s'internaliser, alors que le récepteur α_{2B} possède un profil de désensibilisation et d'internalisation proche du récepteur $ß_2$-adrénergique. Pour le sous-type α_{2c} par contre, la situation est plus compliquée parce qu'une large partie du récepteur est située dans des compartiments intracellulaires dans le réticulum endoplasmique.

Dans tous ces phénomènes, la formation de complexes multi-moléculaires dans lesquels tous les éléments de la cascade de transduction sont en contact est l'événement essentiel. La protéine arrestine apparaît donc plus comme une molécule d'"échafaudage" capable de recruter à la membrane les différents régulateurs de l'endocytose des récepteurs. Cependant l'arrestine ne semble pas être la seule molécule capable de ce type de mobilisation. Les GRK contiennent également un domaine PDZ. Ainsi, la protéine EBP50 (Ezrin-radixin-moesin Binding Protein-50) se lie à GRK5 pour faciliter l'endocytose des récepteurs $ß_2$-adrénergiques dans les cellules HEK 293 (Cao *et al.*, 1999). La phosphorylation de la sérine 411 du récepteur $ß_2$-adrénergique par la kinase GRK5 est nécessaire à l'interaction de la protéine EBP50 et permet le recyclage du récepteur. Grâce à toutes ces interactions, il serait possible d'orienter le récepteur vers les voies de recyclage plutôt que vers celles de la dégradation. En plus de cette interaction avec la protéine EBP50 dans la région C-terminale, le récepteur $ß_2$-adrénergique peut aussi interagir avec l'actine du cytosquelette sous membranaire par un domaine ERM (Ezrin-radixin-moesin, pour revue voir

Tsukita *et al.*, 1997). Là encore, la multiplicité des interactions potentielles entre protéines nécessite d'étudier l'endocytose dans un contexte cellulaire précis.

V.A.4. Interaction de la désensibilisation et des voies des MAPK

Grâce à l'utilisation de mutants dominants négatifs de protéines intervenant dans l'endocytose comme la dynamine ou l'arrestine, les interactions existantes entre l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G et l'activation des voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) a été mieux comprise (Tableau 14). Ainsi, la stimulation "Ras-dépendante" des voies ERK1 et ERK2 (Extracellular signal Regulated Kinase) par les récepteurs $ß_2$-adrénergiques est inhibée lors de l'utilisation des mutants dominants négatifs de ces deux protéines (Daaka *et al.*, 1998). Ces inhibiteurs de l'internalisation bloquent spécifiquement l'activation des MEK par Raf sans modifier la phosphorylation par Ras de Shc et de Raf. Ces résultats indiquent que l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G est nécessaire à l'activation des voies des MAPK.

Récepteur	Blocage de l'endocytose	Lignée cellulaire	Activité ERK
α_{2A}-Adrénergique	Dynamine	COS-1, HEK 293	Pas de changement
α_{2B}-Adrénergique	Dynamine	COS-1, HEK 293	Pas de changement
α_{2C}-Adrénergique	Dynamine	COS-1	Pas de changement
ß-Adrénergique	Dynamine, Arrestine	HEK 293	Baisse de 60%
δ Opioïde	Dynamine	COS-7, HEK 293	Baisse de 80%
μ Opioïde	Dynamine	HEK 293	Baisse de 80%
κ Opioïde	Dynamine, Arrestine	CHO	Pas de changement
	Dynamine	HEK 293	Baisse de 80%
5HT1A	Dynamine, Arrestine	HEK 293	Baisse de 50%
LPA	Dynamine, Arrestine	HEK 293	Baisse de 50 à 80%
CXCR2	Dynamine	HEK 293	Pas de changement

Tableau 14 : Conséquences de l'inhibition de l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G sur l'activité des kinases ERK (d'après Ceresa et Schmid, 2000).

Si la stimulation directe des voies MAPK par les récepteurs est envisageable, il semble que des mécanismes de transactivation interviennent de façon plus courante pour permettre l'activation des voies de signalisation ERK dans les cellules (pour revue voir Lutrell *et al.*, 1999). Ainsi, le récepteur $ß_2$-adrénergique est capable d'activer le récepteur de l'EGF. Une fois les phosphorylations effectuées, le recrutement de différentes protéines adaptatrices (arrestines, c-Src,…) assure la formation du complexe de transduction avec la machinerie d'endocytose et facilite l'activation de la voie ERK dans les cellules COS-7 (Maudsley *et al.*, 2000).

V.B. La régulation de l'expression des récepteurs

Après la formation du complexe de signalisation et son internalisation, les récepteurs sont sujets à un important phénomène de recyclage (Krueger *et al.*, 1997; Morrison *et al.*, 1996; Pippig *et al.*, 1995) alors que la voie de dégradation conduisant aux lysosomes ne semble pas être prépondérante (Dumartin *et al.*, 1998). Les différentes voies de régulation que nous venons de décrire s'appliquent surtout à la régulation à court terme. Aplus long terme, en plus de la dégradation des récepteurs dans la voie lysosomiale, la désensibilisation peut affecter la transfection et ainsi réguler la quantité de récepteurs. Il a été montré qu'après 72 heures de traitement à la dopamine, la liaison des récepteurs au SCH-23390 radiomarqué est diminuée de 81% (Gupta et Mishra, 1993). De plus cette diminution est associée à la baisse du taux de protéine $G_{\alpha s}$, ce qui indique que la désensibilisation à long terme tend à réguler non seulement la quantité de récepteurs cibles mais aussi les intervenants de la voie de signalisation. Une exposition longue à certains agents thérapeutiques entraîne des modifications dans la densité des récepteurs exprimés à la surface des cellules. Ce phénomène de régulation dépend non seulement de l'endocytose et de la dégradation des récepteurs comme nous venons de le voir, mais aussi de la modulation de l'expression du gène qui régule la quantité totale de récepteurs dans la cellule et l'adapte à la situation.

La région 5' non codante des gènes des récepteurs D_{1A} et D_{1B} humains est composée de deux exons séparés par un petit intron. Cette région ne contient pas les sites consensus classiques de l'initiation de la transcription telle que les boîtes TATA, CAAT mais des régions riches en G+C (Beischlag *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Minowa *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992). Cependant, la région promotrice possède des sites consensus de liaison pour un certain nombre de facteurs de transcription dont des éléments de réponses à l'AMPc et aux glucocorticoïdes ainsi que des sites de liaisons à SP1, AP1 et AP2 (Minowa *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1992). Ces données génétiques sont à confronter aux premières expériences effectuées sur la demi-vie des récepteurs dans le cerveau de rat. Ces observations soulignent le rôle possible de la régulation génique dans la modulation du nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule. Des analyses plus approfondies de la région 5' du récepteur D_{1A} humain ont été entreprises pour étudier l'influence de l'AMPc sur la région régulatrice (Minowa *et al.*, 1996). En utilisant le système rapporteur de l'acétyle transférase du chloramphénicol en cotransfection, une augmentation de l'activité du promoteur est observée après un traitement à la forskoline, composé qui stimule directement l'adénylate cyclase. Si des séquences consensus de facteurs de transcription ont été trouvées dans la région 5' non codante (AP1, AP2, CREB, …), ces facteurs ne semblent pas interagir directement avec le promoteur (Minowa *et al.*, 1996). En conséquence,

il est possible que l'effet de trans-activation de l'AMPc soit plutôt un mécanisme indirect dans les cellules SK-N-MC.

Par des techniques analogues, il a également été montré que la région non codante de l'ARNm est impliquée dans l'expression cellule-spécifique des récepteurs D_1. L'expression du rapporteur n'a lieu que dans des cellules qui expriment naturellement le récepteur D_{1A} (NS20Y, Zhou *et al.*, 1992) ou D_{1B} (SK-N-SH, Beischlag *et al.*, 1995). D'autres expériences ont été effectuées sur l'expression cellule-spécifique des récepteurs D_1. Elles montrent par exemple que dans le striatum, la transcription du gène du récepteur D_{1A} est régulée par Brn-4 (Okazawa *et al.*, 1996) facteur qui appartient à la famille des facteurs de transcription POU. Ils sont impliqués dans l'expression spatiale et temporelle des transcrits dans les tissus du système nerveux central et peuvent agir en association, ou entrer en compétition, pour activer le récepteur et réguler sa transcription (Imafuku *et al.*, 1996). En fait, des expériences indiquent qu'il existe deux régions promotrices séparées en amont du gène du récepteur D_{1A}. Des expériences d'inactivation soulignent le rôle possible de ces deux régions dans l'expression spécifique des récepteurs dans différents tissus. Ainsi le premier promoteur n'est pas fonctionnel quand les récepteurs sont exprimés dans des cellules dérivées de rein (Lee *et al.*, 1997), alors qu'il l'est de façon importante dans les cellules SK-N-MC et NS20Y qui expriment les récepteurs D_1 de façon constitutive.

En plus de ces phénomènes de régulation directe de la transcription, certaines molécules sont capables de modifier la stabilité des ARNm. C'est le cas de la ribonucléoprotéine ßARB qui se lie à l'ARNm des récepteurs $ß_1$- et $ß_2$-adrénergiques dans des régions riches en A/C+U du 3' non traduit (Blaxall *et al.*, 2000). Le traitement des récepteurs $ß_2$-adrénergiques par l'isoprotérénol pendant 24 heures diminue la demi-vie des ARNm à 5 heures ce qui prouve leur rôle dans la régulation à long terme de l'expression du récepteur en présence d'agoniste (Hadcock *et al.*, 1989). Toutefois, si les récepteurs $ß_2$-adrénergiques sont les récepteurs à sept segments transmembranaires les plus proches des récepteurs D_1, les différences sont plus importantes dans leurs régions régulatrices. En effet contrairement aux D_1, les récepteurs $ß_2$-adrénergiques possèdent deux “boîtes” TATA et la séquence complémentaire inverse du consensus CAAT (pour revue voir Collins *et al.*, 1989). Il est possible dans ces conditions que les protéines de régulation des ARNm des récepteurs $ß_2$-adrénergiques n'existent pas pour les récepteurs D_1. De plus, l'adaptation de l'expression des ARNm des récepteurs ne semble pas être un facteur de régulation principal des récepteurs D_1 (Sidhu, 1997).

VI. Conclusion

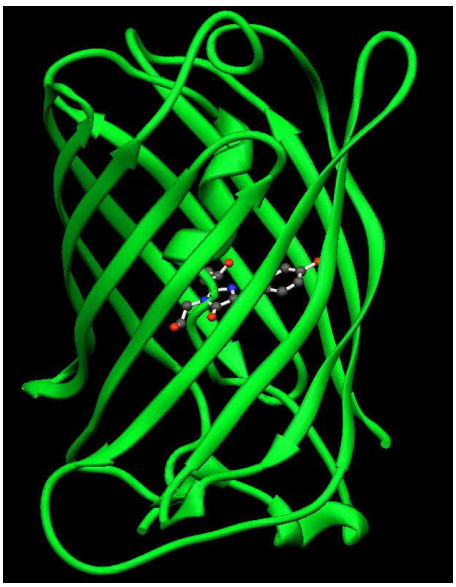
Toutes ces observations montrent qu'il est difficile de trouver pour chaque sous-type de récepteurs de la dopamine des caractéristiques qui les identifie avec précision chez les mammifères. En effet, les analyses pharmacologiques ne permettent pas de discriminer chaque sous-type, leur localisation anatomique est relativement proche et les expériences permettant de comprendre la mise en place d'une localisation polarisée n'ont pas aboutit à des résultats clairs. D'un point de vue fonctionnel, il apparaît de plus en plus que face à la multiplicité des voies de signalisation, c'est la composition du “transducisome” et la manière dont il se forme qui affecte la réponse cellulaire. Les variations importantes qui dépendent des méthodes d'étude ne facilitent pas l'identification de caractéristiques générales pour chaque sous-type du récepteur D_1.

Il est donc important de développer une approche nouvelle afin de pallier à ces problèmes. La mutagenèse dirigée des récepteurs ne permet pas, la plupart du temps, d'obtenir de résultat quant au rôle précis d'un acide aminé en particulier. De plus, chez les souris dont le gène codant pour le récepteur D_{1A} a été inactivé on ne remarque pas de trouble de comportement aussi important que ce que laissait prévoir l'implication importante du récepteur D_1 dans l'initiation motrice (Drago *et al.*, 1994). En effet, si la capacité d'exploration des souris semble un peu diminuée, il n'y a pas d'autres modifications évidentes. D'autres analyses plus précises indiquent que le récepteur est pourtant impliqué dans un large spectre de comportements sans avoir d'effet dominant par lui-même (Smith *et al.*, 1998). Ces observations sont en accord avec le rôle essentiellement neuromodulateur que joue la dopamine, via les récepteurs D_1 dans le système nerveux central.

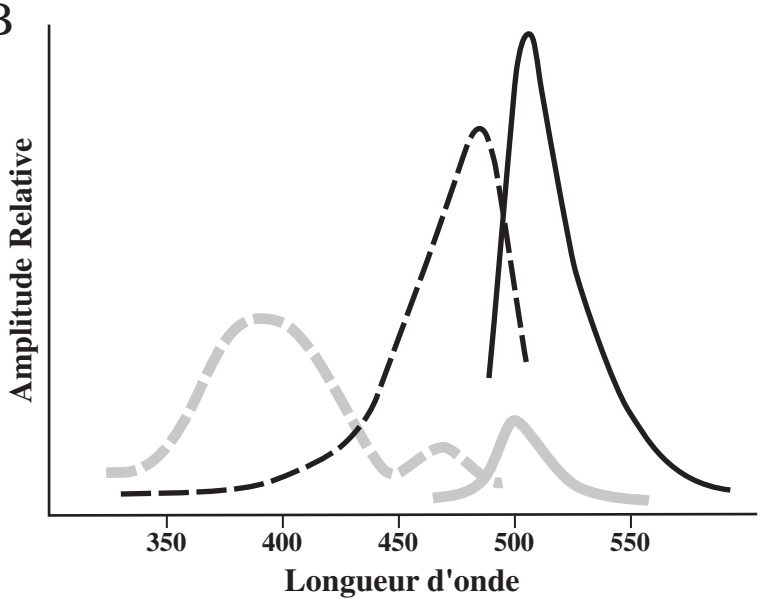
Plutôt que de s'attacher à l'observation d'une espèce particulière comme modèle, le but de notre travail au laboratoire est de dégager des caractères généraux conservés chez tous les vertébrés afin de comprendre comment chaque sous-type s'est mis en place au cours de l'évolution et quelle fonction prépondérante a été sélectionnée pour chacun d'entre eux. Cette orientation méthodologique doit permettre de s'affranchir des particularités d'espèces et d'expression cellulaire spécifique. C'est cette approche fonctionnelle comparée et évolutive qui a été entreprise par la suite.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A



B



Mutation	Maximum d'excitation (nm)	Maximum d'émission (nm)	Couleur
Sauvage	396, 475	508, 503	Vert
Mutation sur la sérine 65			
Ser 65 Ala	471	504	Vert
Ser 65 Cys	479	507	Vert
Ser 65 Lys	484	510	Vert
Ser 65 Thr (EGFP)	488	511	Vert
Ser 65 Gly (Topaze)	514	527	Jaune
Mutation sur la tyrosine 66			
Tyr 66 Phe	360	442	Bleu
Tyr 66 His (BFP)	382	448	Bleu
Tyr 66 Trp	436	485	Cyan

Figure 21 : La protéine GFP et ses variants.

Cette figure récapitule les principales caractéristiques et modifications apportées à la protéine GFP. **A.** La structure tridimensionnelle de la GFP permet d'observer le chromophore au centre d'une structure en tonneau de feuillets ß (Yang *et al*., 1996). **B.** Spectres d'excitation (trait pointillé) et d'émission (trait plein) de la GFP sauvage (ligne grise plus épaisse) et du mutant S65T (ligne noire, Kain et Kitts, 1997).

Le tableau liste de façon partielle les principales modifications apportées au chromophore pour modifier ses propriétés. Entre parenthèses sont indiqués les noms communs de ces protéines. Il est à noter que ces noms correspondent à d'autres mutations en plus de celle du chromophore (d'après Tsien, 1998).

I. Construction des outils moléculaires

I.A. Utilisation de la "Green Fluorescent Protein" (GFP) pour l'analyse du trafic intracellulaire des récepteurs

La caractérisation de la protéine GFP a débuté dans les années 60, et grâce au clonage de l'ADNc de la GFP de la méduse *Aequorea victoria* (Chalfie *et al*., 1994), son expression dans différents types cellulaires a soulevé l'intérêt de la communauté scientifique (pour revue voir Tsien, 1998). Cette protéine est composée de 238 acides aminés et a un poids moléculaire apparent de 27-30 kDa. Son pic d'absorption se situe autour de 395 nm avec un pic plus petit à 475 nm (Figure 21). L'excitation à 395 nm entraîne un pic d'émission maximum à 508 nm. La protéine purifiée est très stable car elle conserve ses propriétés de fluorescence jusqu'à 65°C, dans une gamme de pH allant de 7 à 12 et en condition dénaturante avec 1% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ou 6 M de chlorure de guanidium. Elle résiste également à l'action de nombreuses protéases pendant plusieurs heures et même exprimée en grande quantité, elle n'est pas toxique pour les cellules. L'irradiation de la protéine sauvage peut créer deux changements dans les caractéristiques du spectre :

- Une photoisomérisation importante lors d'une exposition dans les ultraviolets qui diminue progressivement l'amplitude du pic d'absorption à 395 nm pour augmenter celle du pic à 475 nm.
- Un photoblanchiment qui diminue l'amplitude les deux pics de façon équivalente.

Le fluorophore de la GFP est constituée d'un tripeptide cyclique contenant des résidus sérine/thréonine et glycine. Il ne devient fluorescent qu'intégré dans la protéine. La GFP ne nécessite ni substrat ni cofacteur pour émettre de la lumière. Sa structure tridimensionnelle explique en partie ces propriétés particulières (Yang *et al*., 1996). En effet, la GFP est composée d'un ensemble de feuillets ß au milieu desquels se trouve le chromophore (Figure 21). De ce fait, il se retrouve protégé et cela explique la raison pour laquelle la fluorescence de la GFP est si stable dans les cellules quelles que soient les conditions du milieu.

Afin d'améliorer et de modifier les paramètres de fluorescence, de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée ont été initiées. Un premier ensemble de mutation a été isolé. Elles affectent les rapports entre les pics d'absorption. Ainsi les mutations thréonine 203 en isoleucine (T203I) et Glutamine 222 en glycine (Q222G) éliminent respectivement les pics

d'excitation à 475 et 395 nm. Un second type de mutation a permis de modifier les spectres d'émission pour obtenir des couleurs de fluorescence différentes de celles de la protéine sauvage. Ainsi, le remplacement dans le chromophore de la tyrosine 66 par d'autres acides aminés (Heim *et al*., 1994; Heim et Tsien, 1996) permet d'obtenir d'autres couleurs de fluorescence : bleu (Yang *et al*., 1998), jaune ou rouge (Figure 21). La mise à disposition de nombreux mutants de couleurs différentes rend ces protéines utilisables pour le transfert d'énergie par résonance (FRET) qui met en évidence les interactions physiques entre des protéines proches. Ainsi, lorsque les protéines fusionnées se rejoignent, l'énergie se transmet d'un variant de la GFP à un autre.

Cytosquelette
Microtubules
Tubulines α et ß, Tub4p, MAP4, MAP2, Tau, Kinésine, Ncd, Dynéine, P93-dis1
Microfilaments
Actines, Cap2p, Abp1p, Sac6p, Intégrine, Paxilline, Myosine, Titine, Moésine, Coronine
Filaments Intermédiaires
Vimentine, Laminine
Protéines Associées
FtsZ, FtsA, ZipA
Voie de Sécretion
Chromogranine, Recepteur KDEL, HmgRp, TGN38, Transporteur du glucose régulé par l'insuline
Noyau
Récepteur aux glucocorticoïdes, Histone, Nucléoplasmine
Mitochondrie
Signal d'import de la mitochondrie
Péroxisome
Signal d'import du péroxisome (SKL)
Membrane Plasmique
GAP-43, Ras, Caveoline, Récepteurs de l'endothéline, du facteur de libération de la Gastrine, de l'EGF, de la cholecystokinine, de l'hormone libérant la Thyréotropine, Récepteurs NMDA, $ß_2$-Adrénergiques, α_{1B}-Adrénergiques
Cytoplasme
PKC, GRK, ß-arrestine

Tableau 15 : Exemples de protéines fusionnées à la GFP.

Ces exemples d'utilisation de la GFP sont présentés en fonction des compartiments cellulaires où s'expriment les protéines fusionnées (d'après Gerdes et Kaether, 1996; Ludin et Matus, 1998).

A côté de la tyrosine 66, le remplacement de la sérine 65 induit la perte du pic d'absorption à 395 nm avec un amincissement du spectre d'émission (Figure 21). La modification la plus importante est la mutation de la sérine 65 en thréonine (S65T) qui confère à la GFP trois propriétés avantageuses :

- elle a six fois plus de brillance que le sauvage.

- l'oxydation permettant de former le fluorophore est quatre fois plus rapide.
- on n'observe aucune photoisomérisation et seulement un très faible photoblanchiment (environ un quart de delui de la fluorescéine, Heim *et al.*, 1995; Heim et Tsien, 1996; Kain *et al.*, 1995).

Cette GFP optimisée a été utilisés avec succès dans un très grand nombre d'espèces, des plantes aux mammifères (Zernicka-Goetz *et al.*, 1997). C'est principalement dans le domaine de la biologie cellulaire que les principaux développements ont été réalisés (pour revue voir Gerdes et Kaether, 1996). Ces applications ouvrent la voie de l'observation dynamique des protéines intervenant dans la biologie de la cellule (Tableau 15).

L'analyse de la désensibilisation des récepteurs nécessite des techniques d'analyse biochimiques lourdes et délicates, que ce soit pour la mesure des états de phosphorylation que pour l'observation de l'internalisation de ces protéines. Avec la découverte de la GFP, la possibilité d'étudier les récepteurs couplés aux protéines G et leur régulation en temps réel est devenue possible (Ferguson, 1998). Jusqu'à présent, la GFP a été utilisée pour l'étude de plusieurs récepteurs : le récepteur de la protéine chemoattractive de l'AMPc (CAR1) chez *Dictostelium discoideum*, le récepteur $ß_2$-adrénergique (Barak *et al.*, 1997b) et le récepteur de la cholecystokinine de type A (CCKAR, Tarasova *et al.*, 1997). Les résultats les plus intéressants ont été obtenus pour ce dernier récepteur. En effet, ses propriétés de désensibilisation différent selon le type cellulaire dans lequel il est exprimé. Dans les cellules CHO, COS-1 et HeLa, le récepteur est internalisé de façon dépendante de la présence de l'agoniste alors que dans les cellules NIH3T3, le récepteur est constitutivement internalisé. De plus, alors que le récepteur $ß_2$-adrénergique est dirigé vers la voie lysosomale après endocytose, le récepteur CCKAR emprunte aussi les endosomes mais sans se retrouver dans le compartiment de dégradation. En plus des récepteurs couplés aux protéines G, la GFP a aussi été fusionnée aux protéines régulatrices intervenant dans leur désensibilisation. La chimère arrestine 2-GFP constitue un outil intéressant d'analyse des interactions avec les récepteurs. En effet, elle se redistribue rapidement du cytoplasme vers la membrane lors du traitement des récepteurs $ß_2$ avec un agoniste adrénergique (Barak *et al.*, 1997a). Cette translocation a aussi été observée en temps réel à l'aide de fusion avec la GFP, pour la PKCßII et la GRK2 après stimulation du récepteur à la substance P (Barak *et al.*, 1999). Grâce à la relocalisation de la PKCßII à la membrane plasmique, il a été constaté que l'activation du récepteur débute dès les premières secondes de stimulation. De même il a été montré que la désensibilisation avait lieu dans les 30 premières secondes pendant lesquelles la protéine GRK2 se redistribuait du cytoplasme à la membrane plasmique. Le récepteur est alors phosphorylé, et la ß-arrestine se retrouve localisée à la membrane plasmique environ une minute après le début de la stimulation.

Ces éléments, et les nombreux travaux accomplis, font de la GFP un très bon outil pour l'analyse dynamique des mécanismes cellulaires de la régulation des récepteurs (pour revue voir Kain et Kitts, 1997). Nous avons donc choisi d'utiliser dans notre approche, l'étiquetage des récepteurs D_1 avec la GFP. Le but était de faciliter la visualisation directe des récepteurs dans les cellules en culture, et par la suite leur observation dans différents modèles *in vivo*.

I.B. Méthodes de construction des fusions D_1-GFP

La fusion d'une étiquette VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus – Glycoprotein, Kreis, 1986), reconnue par un anticoprs monoclonal spécifique, à l'extrémité N-terminale, et de la protéine GFP à l'extrémité C-terminale de chaque sous-type du récepteur D_1 d'anguille, a été effectuée dans le plasmide pEGFP-N1 (Clonetech, Figure 22). Afin de s'assurer de la traduction des trois séquences fusionnées en une seule phase de lecture, le codon d'initiation de la protéine GFP du vecteur pEGFP-N1 a été modifié en valine pour éviter la réinitiation de la traduction (Figure 22). L'introduction de cette mutation a été obtenue par amplification, par la technique de PCR, des gènes codant pour les récepteurs à l'aide d'oligonucléotides modifiés contenant les mutations. La PCR est effectuée avec la polymérase de *Pyroccoccus furiosis* (Pfu, Stratagene) pour éviter les erreurs de réplication. Le mélange de PCR (2 unités de l'ADN polymérase Pfu, tampon de l'ADN polymérase Pfu, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 250 µM) contenant 10 ng de plasmide et 10 pmoles de chaque amorce est amplifié pendant 30 cycles. Une étape de 10 minutes à 94°C inactive la Pfu suivi de 10 minutes à 72°C en présence d'ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq, Promega), ce qui permet d'ajouter des oligonucléotides adénine à l'extrémité 3', facilitant ainsi l'insertion des produits de PCR dans un vecteur adéquat pour le clonage. L'étiquette VSV-G a été ajoutée par insertion d'un oligonucléotide double-brin dans le site Hind III du vecteur pEGFP-N1 (Figure 22). L'hybridation des deux oligonucléotides codant cet épitope reconstitue un fragment double-brin formant des extrémités cohésives correspondant aux sites de digestions des enzymes BamH I et Hind III, permettant l'insertion directionnelle du fragment dans le vecteur d'expression. Une séquence consensus d'initiation (Kozak) de la traduction a été introduite dans l'étiquette VSV-G (Kozak, 1986; Kozak, 1987). Enfin, le récepteur a été muté afin, de supprimer le codon d'initiation et toute la partie 5' non codante, et de modifier le codon "stop" pour obtenir la fusion avec la séquence de la GFP. Le mutant du récepteur a été obtenu également par la technique de la PCR. L'oligonucléotide choisi dans la région 5', (i) introduit un site de digestion pour BamH I, (ii) maintient le cadre de lecture entre l'étiquette VSV-G et le récepteur, (iii) mute la méthionine d'initiation en lysine et (iiii) apporte deux acides aminés charnière avec le récepteur, afin d'éloigner l'étiquette VSV-G des sites de

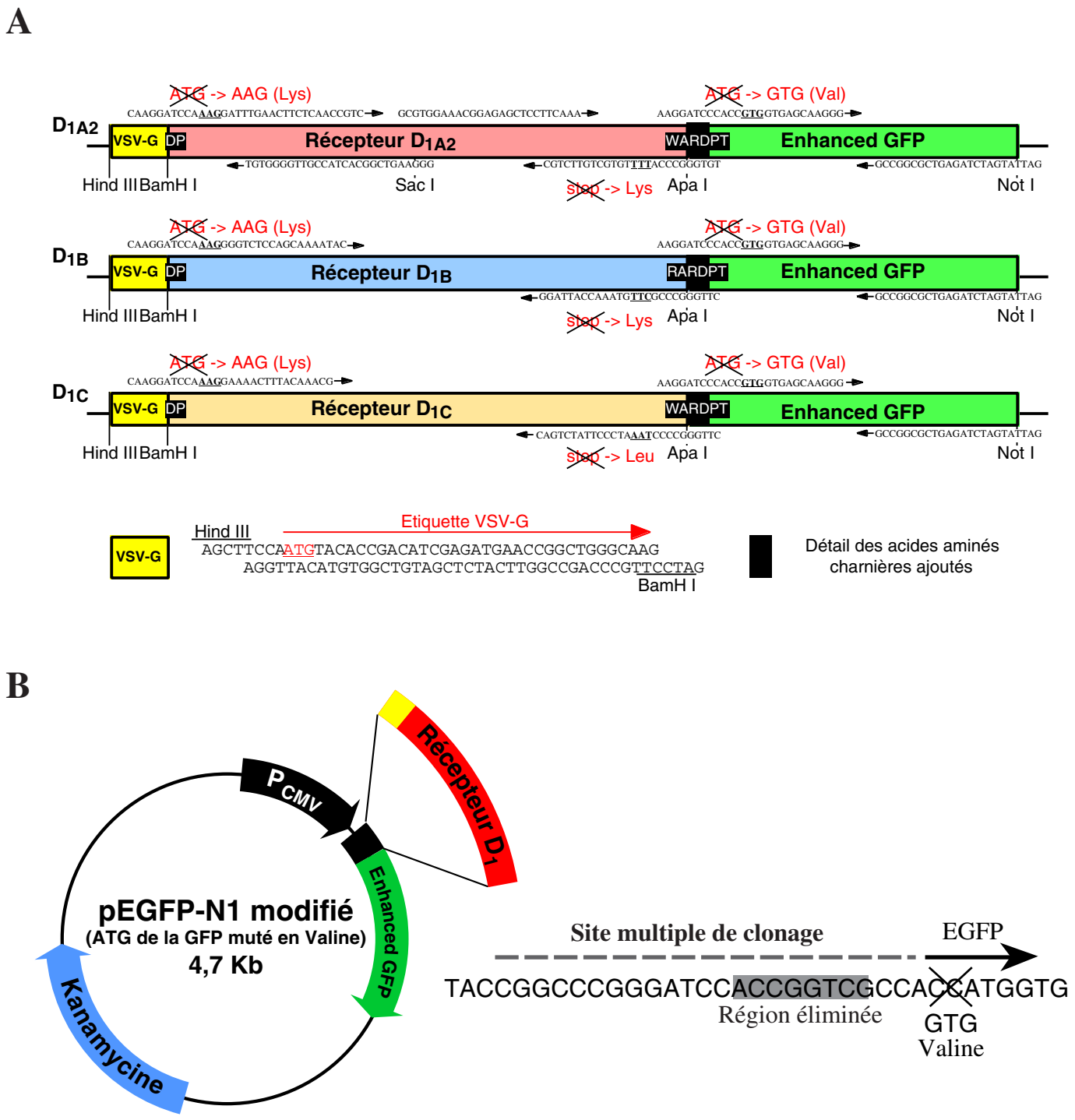


Figure 22 : Construction des protéines de fusion récepteur D_1-GFP.

A. Les protéines de fusion ont été fabriquées pour chacun des sous-types du récepteur D_1 d'anguille avec une étiquette VSV-G à l'extrémité N-terminale et la protéine GFP à l'extrémité C-terminale. Les oligonucléotides utilisés pour la construction sont détaillés au dessus de leur séquence complémentaire et chacune des mutations introduites est mise en évidence. Deux séquences charnières ont été introduites, l'une de deux acides aminés entre l'étiquette VSV-G et le récepteur, et l'autre de 6 acides aminés entre le récepteur et la GFP. La séquence de ces charnières est donnée (boîtes noires) et les principaux sites de restriction utilisés sont repérés sur chaque construction. **B.** Schéma du plasmide pEGFP-N1 (Clonetech) présentant un site multiple de clonage modifié afin d'éliminer le codon d'initiation de la traduction de la GFP.

glycosylation pouvant masquer l'épitope. Dans la région 3', l'oligonucléotide modifie le codon "stop" en lysine, conserve la phase avec la protéine GFP dans le plasmide pEGFP-N1 et introduit le site de digestion Apa I. Les constructions ont été obtenues de deux manières. Pour le récepteur D_{1A2}, deux fragments de PCR de petite taille, et donc moins sujets aux erreurs lors de l'étape d'élongation par la polymérase, ont été amplifiés dans les régions 5' et 3' et séquencés pour vérifier leur intégrité. Pour le récepteur D_{1A2} d'anguille, la construction a donc été effectuée en deux étapes à l'aide du site unique Sac I qui se trouve dans la séquence codante du récepteur. Dans le cas des récepteurs D_{1B} et D_{1C}, la PCR est réalisée directement avec les oligonucléotides des mutations 5' et 3'. Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée ainsi que les détails de la construction sont indiqués sur la Figure 22.

Nom	Vecteur	Séquence
PCR sur colonies		
T7	pcDNA3	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
SP6	pcDNA3	5' ATTTAGGTGACACTATA 3'
GFPN1-5'	pEGFP-N1	5' CCGGACACGCTGAAC 3'
GFPN1-3'	pEGFP-N1	5' AGTGAACCGTCAGATCC 3'
Séquence		
GFPN1-5'	pEGFP-N1	5' CCGGACACGCTGAAC 3'
GFPN1-3'	pEGFP-N1	5' AGTGAACCGTCAGATCC 3'
GFPN12-3'	pEGFP-N1	5' ATGGGCACCACCCCG 3'
D1BAN505	Récepteur D_{1B} d'anguille	5' GTACCTATCCACGCTTA 3'
D1CAN495	Récepteur D_{1C} d'anguille	5' GATATGAACGTAAGATG 3'

Tableau 16 : Les oligonucléotides utilisés lors des différentes étapes du clonage.

Les principales étapes de clonage ont été effectuées à l'aide du kit "TA Cloning" (Invitrogen). Ce kit assure le clonage rapide des produits d'amplification par PCR dans un vecteur spécifique (pCR™ II) qui exploite la création d'extrémités adénine 3' "débordantes" par la Taq polymérase. Les sites introduits par les oligonucléotides de PCR sont alors utilisés pour le transfert du fragment amplifié dans le site multiple de clonage du vecteur pEGFP-N1. La transformation des bactéries compétentes (*Escherichia coli* XL1 Blue) s'effectue par choc thermique avec les plasmides recombinants (Sambrook *et al.*, 1989). Les clones bactériens obtenus sont analysés par PCR sur colonies bactériennes. Cette technique rapide consiste à amplifier l'insert contenu dans le vecteur pCR™ II directement sur des colonies prélevées au cure-dent, grâce à des amorces externes situées sur le plasmide (oligonucléotides T7 et SP6). Ici, seule l'ADN polymérase Taq est utilisée et les différentes étapes de l'amplification sont ramenées à 30 secondes chacune. Cette méthode d'amplification a aussi été employée pour analyser le clonage dans le vecteur pEGFP-N1 (voir Tableau 16 pour les séquences des oligonucléotides utilisés). Une fois les clones positifs chosis, l'ADN plasmidique est extrait des cultures de bactéries à l'aide de kit (Promega) basé sur le principe de la lyse alcaline. Après digestion des

plasmides, les inserts sont purifiés soit par chromatographie d'exclusion des hauts poids moléculaires (colonnes S400, Pharmacia), soit par purification de bandes découpées dans un gel d'agarose (QiaEx, Qiagen).

La vérification des constructions par séquençage est faite à l'aide du kit OmniBase (Promega) ou ThermoSequenase (Amersham) qui utilise les avantages d'une ADN polymérase thermostable pour appliquer les principes de l'amplification par PCR au séquençage, ce qui permet d'utiliser une quantité de matrice beaucoup plus faible. Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont décrits dans le Tableau 16.

II. Méthodes d'analyses biochimiques et pharmacologiques

II.A. L'analyse pharmacologique des récepteurs

II.A.1. Dosage par liaison à l'équilibre des récepteurs

Ce dosage permet de déterminer la constante d'affinité du ligand (Kd) pour le récepteur et d'évaluer le nombre total de sites de liaisons spécifiques (Bmax) présents sur les extraits membranaires. La liaison spécifique est calculée par soustraction des valeurs de liaison non spécifique, de celles de la liaison totale.

Les cellules confluentes (boîtes de 150 mm de diamètre) sont récupérées dans du tampon de "liaison" (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 1,5 mM, $MgCl_2$ 5 mM et EDTA 5 mM). Les cellules sont homogénéisées au Polytron (30 secondes). Les membranes des cellules sont collectées par centrifugation 20 minutes à 10000 g à 4°C, puis homogénéisées une nouvelle fois dans le tampon de "liaison". La quantité de protéines est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Environ 50 μg de protéines membranaires sont alors incubées avec différentes concentrations d'un ligand spécifique des récepteurs D_1, le ^{3}H-SCH-23390 (de $3x10^{-11}$ M à $2x10^{-9}$ M, Amersham) et la liaison non spécifique est mesurée en présence d'une concentration saturante (10 μM) d'un antagoniste le (+)-Butaclamol-HCl (RBI). La réaction se déroule jusqu'à la saturation de la liaison du récepteur, à température ambiante pendant 90 minutes. Le mélange est alors filtré sur des membranes en laine de verre GF/C de 25 mm de diamètre (Whatman) à l'aide d'un appareil à filtration (Millipore) pour séparer le ligand fixé au récepteur de celui encore libre en solution. Les filtres sont lavés deux fois (Tris HCl 50 mM pH 7.4) et la radioactivité est quantifiée dans un compteur LKB ß avec du mélange scintillant ACS (Amersham). Chaque point de mesure est dupliqué.

II.A.2. Dosage par déplacement de la liaison à l'équilibre ("compétition")

Les constantes de déplacement du SCH-23390 (Ki) par compétition de différents composés sont obtenues de la même manière. Après récupération des membranes, environ 50 μg de protéines membranaires sont alors mélangés avec 100 pM de ^{3}H-SCH-23390 et des dilutions en série (de 10^{-4} M à 10^{-12} M) des ligands en compétition (RBI, Sigma-Aldrich). Le protocole est identique à la technique précédente. Le calcul des constantes de déplacement (Ki) s'effectue selon la formule suivante, où le Kd représente la constante de dissociation calculée par la liaison de ligand à l'équilibre et l'Ic50 représente la concentration de ligand qui déplace 50% du ligand radioactif.

$$Ki = \frac{Ic50}{1 + \frac{\left[^3H - SCH23390\right]}{Kd}}$$

II.B. Les outils de l'analyse biochimique

II.B.1. Western blot

Pour récupérer les protéines membranaires, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X et récupérées dans du tampon de lyse (Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Triton X-100 1%, Fluorure de sodium 50 mM, EDTA 5 mM contenant des inhibiteurs de protéases Leupeptine 1 μg/ml, Aprotinine 1%, Pyrophosphate de sodium 10 mM, Orthovanadate de sodium 1 mM et AEBSF ou PMSF 1 mM). Pour les récepteurs D_1 on ajoute 1% de digitonine dans le tampon de lyse afin de faciliter leur solubilisation (Niznik *et al.*, 1986). Après un passage au vortex, les membranes sont récupérées par centrifugation 10 minutes à 12000 g. On dépose en général autour de 100 μg de protéines sur un grand gel (11 x 14 cm) et 50 μg sur un petit gel (6 x 9 cm) que l'on a au préalable mélangé au tampon de charge (Tris HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, Glycérol 10% et 0,1% de Bleu de Bromophénol) auquel on rajoute du 2-Mercaptoéthanol à 5% final. Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C, et migrent dans le gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante (SDS 10%) dans du tampon de migration (Tris HCl 25 mM, Glycine 192 mM et SDS 0,1%).

Pour le transfert, le tampon (Méthanol 20% dans du tampon de migration) utilisé est filtré avant son utilisation. L'électro-transfert sur la membrane de PVDF (Immobilon P, Millipore) dure entre 30 et 90 minutes selon la taille du gel. Il est effectué à 15 V et 3 mA/cm^2 pour un petit gel ou 5mA/cm^2 pour un grand gel (BioRad). A la fin du transfert, on vérifie que le transfert s'est

bien déroulé en incubant la membrane 5 minutes dans du rouge ponceau 0,1% (Sigma) dilué dans de l'acide acétique 20%, puis en rinçant la membrane à l'eau distillée.

Pour l'immunomarquage, toutes les solutions utilisées sont également filtrées sur un filtre 0,45 μm afin de diminuer le bruit de fond. Les sites non spécifiques présents sur la membrane sont bloqués avec une solution de TBS 1X (Tris HCl 25 mM, NaCl 140 mM et KCl 3 mM), Tween 0,1%, Lait 5% et Thimérosal (4/1000e), sauf lors de l'utilisation d'anticorps anti-phosphotyrosine où l'on remplace le lait par 3% d'albumine de sérum de bœuf équilibrée à pH 7 (Research organics). Le blocage est effectué sur la nuit à 4°C. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage et mis au contact de la membrane pendant 2 heures minimum sous agitation à température ambiante, ou à 4°C, selon l'anticorps utilisé. La membrane est lavée cinq fois 5 minutes dans du TBS 1X et Tween 0,1%. L'anticorps secondaire dilué au 1/10000e est incubé dans le milieu de blocage 2 heures à température ambiante aussi bien pour l'anticorps anti-souris (Promega) que pour l'anticorps anti-lapin (Amersham) tous les deux couplés à la HRP (Horse Radish Peroxydase). La membrane est une nouvelle fois lavée cinq fois 5 minutes dans du TBS 1X Tween 0,1%, et sa révélation est effectuée par une réaction luminescente avec le réactif SuperSignal (PIERCE).

II.B.2. Production de la protéine GST-elk

Les bactéries BL21 Lys S contenant le plasmide pGEX-elk (substrat des MAPK) sont ensemencées sur la nuit dans du milieu contenant de l'ampicilline (50 μg/ml) et du chloramphénicol (34 μg/ml). Le lendemain, la culture est diluée cinquante fois et remise à croître jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm atteigne 0,6. La production de la protéine est alors induite pendant 3 heures en ajoutant dans le milieu de culture de l'Isopropyl ß-D Thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) à 1 mM final. Le culot bactérien est alors lavé avec du PBS froid (NaCl 140 mM, KCl 3 mM et KH_2PO_4 2 mM) et repris dans du tampon de production (Hépès 10 mM pH 7.6, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Glycérol 17%, EDTA 0,1 mM, NP-40 0,05% et les inhibiteurs de protéases CLAP 1/1000e, Aprotinine 2 μg/ml, PMSF 1 mM et Benzamidine 1 mM) puis lysé par sonication en appliquant quatre salves de 10 secondes à 40 Watts. Le lysat est centrifugé deux fois 30 minutes à 10000 g. Une aliquote des surnageants de chaque étape est conservée pour l'analyse sur gel.

Un millilitre de la résine Ni^{2+}-NTA-agarose (30/30 Qiagen) est lavé avec le tampon de production et ajouté à 20 ml de surnageants de lysats avec de l'imidazole 10 mM final pH 7. Après 2 heures d'agitation à 4°C, le mélange est déposé sur une colonne de chromatographie (Poly-Prep Chromatography Columns, BioRad). La colonne est lavée avec le tampon de production contenant de l'imidazole à 40 mM et l'élution est effectuée avec du tampon de

production contenant 200 mM d'imidazole. Chaque fraction ainsi obtenue est conservée. On dépose sur un gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante (SDS 10%) une partie de chacune des fractions avec du tampon d'échantillon. Après coloration au bleu de Coomassie, les fractions contenant la protéine GST-elk sont conservées et éventuellement regroupées et un test d'activité kinase est effectué. Une fois que les fractions sont caractérisées, on les dialyse contre un grand volume (3 fois 1 litre) de tampon de production contenant les inhibiteurs plus dilués (Aprotinine 2μg/ml, PMSF 0,5mM, Benzamidine 0,5mM et CLAP 1/10000e). Les fractions dialysées sont récupérées et aliquotées pour être conservées à –80°C.

II.B.3. Immunoprécipitation de la protéine GFP

Les cellules sont récupérées de la même façon que pour le western blot et après 10 minutes de centrifugation à 10000 g, la même quantité de protéine pour chaque échantillon est mise à immunoprécipiter avec l'anticorps anti-GFP (Roche) pendant 2 heures à 4°C. La protéine-G sépharose (Amersham, cinq fois le volume de l'anticorps) est ajoutée au surnageant. Après une nouvelle incubation de 3 heures à 4°C, le culot est lavé quatre fois dans du tampon de lyse. Enfin après une dernière centrifugation d'une minute à 10000 g, le culot est repris dans du tampon d'échantillon et migré sur un gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante (SDS 10%) après avoir été chauffé 3 minutes à 95°C.

II.C. Analyse fonctionnelle

II.C.1. Dosage de l'activité de l'adénylate cyclase

L'activité enzymatique est mesurée à l'équilibre par le taux de production d'^{32}P-AMPc à partir du ^{32}P-αATP incubé avec un homogénat membranaire préparé à partir du matériel étudié. L'AMPc est ensuite séparé de l'ATP par chromatographie (Johnson *et al.*, 1994; Johnson et Salomon, 1991; Salomon *et al.*, 1974). Les homogénats membranaires sont obtenus à peu près comme pour les méthodes de liaison pharmacologiques. Les cellules confluentes sont récupérées et centrifugées 15 minutes à 5000 g à 4°C. Le culot repris dans le tampon 1 (Tris HCl 30 mM pH 7.3, EGTA 10 mM et sucrose 3%) est homogénéisé dans un potter verre/verre. Après une première centrifugation de 3 minutes à 900 g, le surnageant est centrifugé 20 minutes à 19000 g. Le culot est repris dans le plus petit volume possible de tampon 2 (Tris HCl 30 mM pH 7.3, EGTA 10 mM et sucrose 10%). Le témoin de dosage est obtenu à partir de striatum de rat homogénéisé par passage dans un potter verre/verre en présence de tampon 1. Les membranes, à raison de 20 à 40 μg de protéines, sont incubées pendant 30 minutes à 37°C dans un milieu

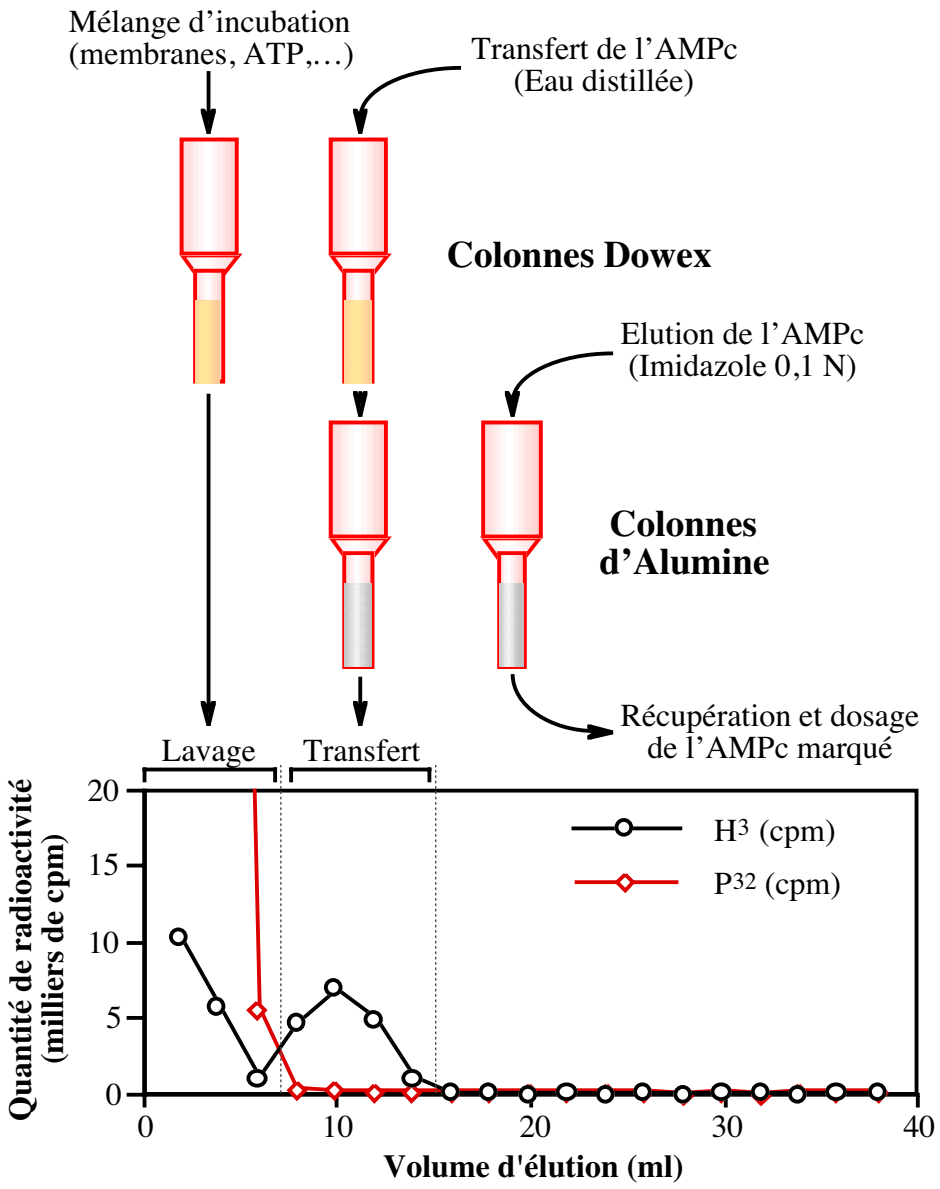


Figure 23 : Dosage de l'activité de l'adénylate cyclase.

Le principe du dosage est représenté sur ce schéma. Les différentes étapes du protocole sont mentionnées au-dessus du profil d'élution des colonnes Dowex qui séparent l'ATP de l'AMPc identifiés par des marqueurs radioactifs différents (^{32}P et ^{3}H respectivement). L'AMPc marqué est dosé après élution à l'imidazole.

contenant du Tris-maléate 50 mM à pH 7.2, du GTP 0,01 mM pour le fonctionnement des protéines G, en présence d'un système régénérateur d'ATP (créatine phosphate 5 mM et créatine kinase 5 mM), d'un inhibiteur des phosphodiestérases (théophylline 10 mM), d'un inactivateur des enzymes contaminantes (AMPc 10 mM), de catalyseurs de la formation d'AMPc (ATP 0,15 mM et $MgSO_4$ 1,5 mM), d'un marqueur pour calculer le rendement de chaque colonne (0,1 µCi de ^{3}H-AMPc) et du substrat marqué (1 µCi de ^{32}P-αATP). L'incubation est arrêtée par dilution dans du tampon d'arrêt (Tris maléate 43 mM, ATP 1,6 mM, AMPc 4,3 mM, $CaCl_2$ 10 mM et HCl 0,1 M).

La séparation de l'ATP marqué de l'AMPc est effectuée sur une colonne échangeuse d'ions Dowex (AB50 Wx8, BioRad) puis avec une colonne d'alumine adsorbant les nucléotides (Figure 23). L'ATP non converti en AMPc est éliminé par la première étape de lavage (4 ml d'eau distillée). Les colonnes Dowex sont ensuite éluées avec 8 ml d'eau distillée pour transférer l'AMPc sur les colonnes d'alumine où il se fixe. L'AMPc est enfin décroché par 8 ml d'une solution d'imidazole 0,1 M. La quantité de radioactivité ^{3}H et ^{32}P est mesurée dans un compteur à scintillation avec du mélange scintillant (ACS, Amersham). L'activité de l'adénylate cyclase est égale au taux de ^{32}P-AMPc mesuré et rapporté à la quantité de ^{32}P-AMPc synthétisé. L'activité est rectifiée par le rendement de la colonne et elle est rapportée à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon par minute d'incubation.

$$\begin{matrix}\text{activité}\\ \text{adénylate}\\ \text{cyclase}\end{matrix} = \frac{^{32}\text{P - AMPc élué}}{^{32}\text{P - ATP total}} \times [\text{ATP froid}] \times \frac{^{3}\text{H - AMPc total}}{^{3}\text{H - AMPc élué}} \times [\text{protéines (mg)}] \times \text{min}$$

II.C.2. Dosage de l'accumulation d'AMPc

Deux méthodes de dosage ont été utilisées. La première méthode employée pour obtenir les résultats préliminaires utilisait un kit de dosage immunologique (AMPc RIA, Amersham ou Cayman Chemical), dont le principe est fondé sur une compétition entre l'AMPc de l'échantillon et une quantité d'AMPc "traceur". L'anticorps fixé à cet AMPc "traceur" est ensuite révélé par coloration. La deuxième méthode, employée tout au long de ce travail, utilise le même principe de compétition mais cette fois à l'aide de la PKA, une protéine à forte affinité pour l'AMPc que l'on trouve en grande quantité dans les cortico-surrénales (Nordstedt et Fredholm, 1990).

Cette protéine est préparée par homogénéisation au polytron de cortico-surrénales de bœuf avec du tampon A (Tris HCl 100 mM pH 7.4, NaCl 250 mM, EDTA 10 mM, 2-Mercaptoethanol 0,1% et sucrose 250 mM) puis filtration du broyat sur gaze stérile et centrifugation à 30000 g, 1 heure à 4°C. Le surnageant dégraissé est directement utilisable. L'AMPc est extrait des cultures en présence d'acide chlorhydrique 0,2 N dans le milieu de

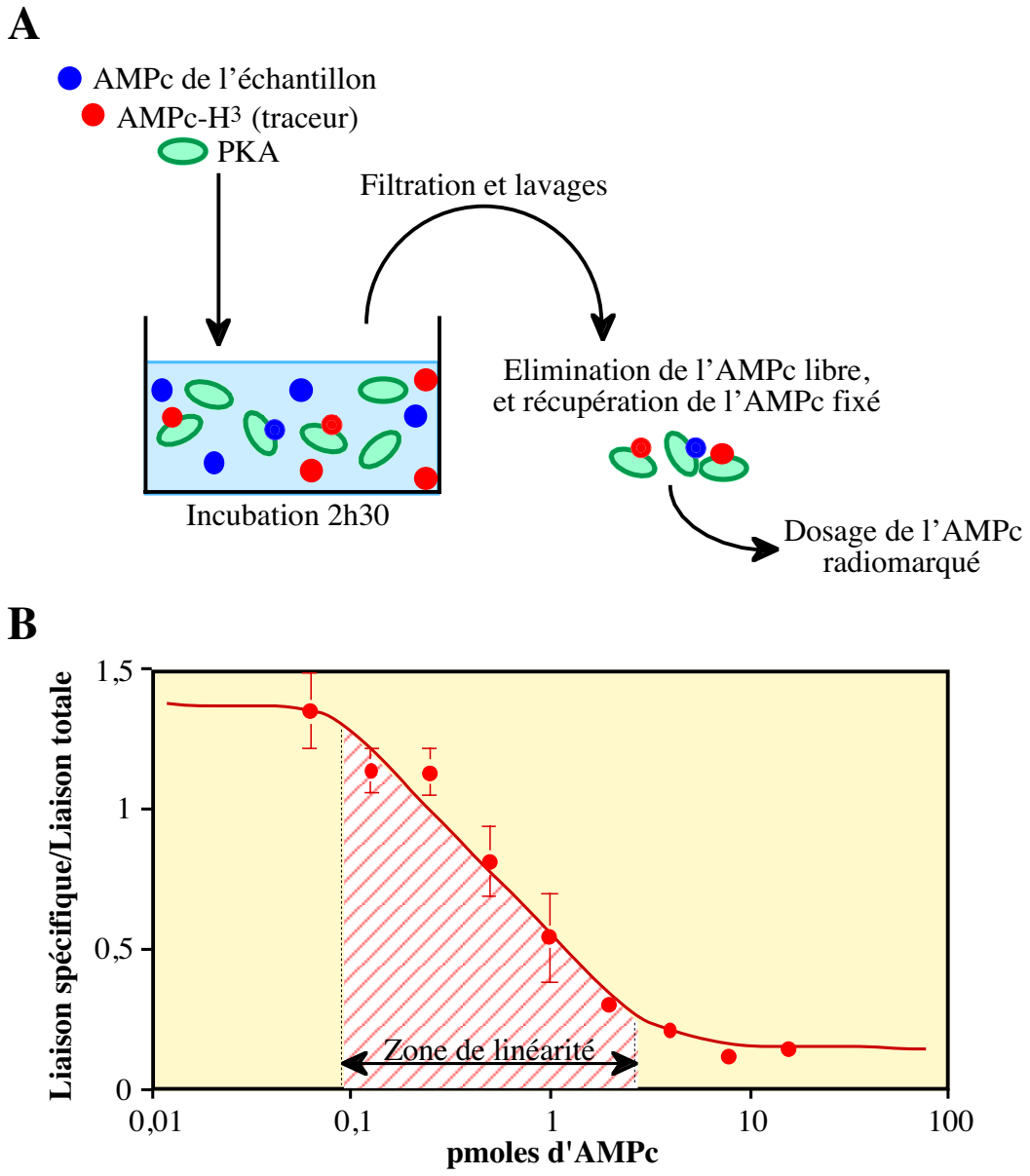


Figure 24 : Dosage de l'accumulation d'AMPc.

A. Ce dosage est basé sur la compétition entre l'AMPc de l'échantillon et de l'AMPc radiomarqué (^{3}H) pour une protéine à forte affinité pour l'AMPc (PKA). **B.** La quantité d'AMPc (exprimée en pmoles) présente dans l'échantillon est calculée grâce à une courbe étalon. La mesure n'est valable que pour la portion linéaire de la courbe étalon. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type à la moyenne (n = 5).

culture sur la nuit à 4°C. L'extrait est récupéré et neutralisé par du Tris 1 M. Le dosage est effectué en mettant en présence l'échantillon neutralisé avec 0,2 pmoles de ^{3}H-AMPc (Amersham) utilisé comme traceur, et 40 μg de protéine de liaison, dans un volume final de 200 μl de tampon A. Ce mélange est incubé 150 minutes à 4°C puis déposé sur un filtre (Whatman GF/C) qui est ensuite rincé deux fois avec du tampon de lavage (Tris HCl 50 mM pH 7.4). La radioactivité est dosée en présence de mélange scintillant avec un compteur à scintillation. Une gamme d'AMPc de 8 pmoles à 0,125 pmoles est effectuée à chaque dosage, la concentration de la solution mère d'AMPc étant dosée au spectrophotomètre à 256 nm (Figure 24). La quantité d'AMPc est donc exprimée en pmoles par puits. La quantité de protéines présente est mesurée par la méthode de Bradford afin d'avoir une idée du nombre de cellules au fond de chacun des puits. Enfin, grâce au dosage de liaison à l'équilibre, la mesure du Bmax (fmoles de récepteurs/mg de protéines) nous donne une estimation du nombre de récepteurs exprimés dans les cellules. La quantité d'AMPc produite par mg de protéines est donc rapportée à la valeur du Bmax, ce qui donne un nombre de fmoles d'AMPc produites par fmoles de récepteurs.

II.C.3. Dosage de l'activité MAPK

Les cellules sont transfectées par 5 μg d'ADN du récepteur à tester, 2 μg du plasmide rapporteur ßGalactosidase et 5 μg du plasmide codant pour la MAPK étiquetée par l'hémagglutinine virale HA (Meloche *et al.*, 1992). Chaque électroporation est mise en culture dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre. Pour tester l'activité de la MAPK en absence de sérum (activateur important de la voie MAPK), il est nécessaire de passer les cellules 18 heures avant le traitement dans un milieu sans sérum avec 0,3% d'albumine de sérum de bœuf (BSA). Les cellules sont laissées en culture pendant 3 à 4 jours avant le dosage.

A la suite des différents traitements, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X à 4°C et les boîtes sont déposées sur de la glace. Après aspiration complète du PBS, on récupère les cellules dans 500 μl de tampon de lyse (Tris HCl pH 7.5 50 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 1%, Fluorure de sodium 50 mM, EDTA 5 mM avec des inhibiteurs de protéases : Orthovanadate de Sodium 1 mM et PMSF 1 mM). Après passage au vortex, les homogénats sont centrifugés 15 minutes à 10000 g. Après quantification des protéines, un dixième du surnageant est conservé pour tester l'activité de la ßGalactosidase et le reste est utilisé pour l'immunoprécipitation de l'hémagglutinine à l'aide d'un anticorps monoclonal (12CA5) après ajout de sérum anti-HA (ascite) et de pansorbine (Calbiochem) dans un rapport de 1/10 volume à volume. Après 2 heures d'incubation à 4°C sous agitation, les culots sont lavés quatre fois dans du tampon de lyse. Après le dernier lavage, les culots sont resuspendus, et un quart du volume

est conservé pour analyser les protéines sur gel de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes (SDS 10%).

Le reste du surnageant est centrifugé une nouvelle fois et le culot est resuspendu dans le tampon de dosage de l'activité kinase (Hépès 20 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 10 mM, p-NitroPhenyl Phosphate 20 mM, DTT 1 mM, ATP 0,2 mM) avec 111 pmoles de ^{32}P-γATP et le substrat elk (facteur de transcription) de la MAPK. Au bout de 15 minutes d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée avec le tampon d'échantillon cinq fois concentré. Le mélange est chauffé 3 minutes à 95°C et, après une centrifugation rapide, l'échantillon est déposé sur un gel de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes (SDS 10%) et mis à migrer sur la nuit. Après séchage, le gel est analysé au PhosphorImager (Molecular Dynamic) pour quantifier l'incorporation de ^{32}P.

Pour le dosage de l'activité de la ßGalactosidase, les lysats sont incubés avec de l'O-Nitrophenyl ß-D-Galactopyranoside 0,8 mg/ml (ONPG, Sigma) dans du tampon (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM et 2-Mercaptoethanol 50 mM) à 37°C jusqu'à ce que la solution devienne jaune. La réaction est arrêtée en ajoutant du Na_2CO_3 1 M, et les densités optiques obtenues sont mesurés au spectrophotomètre à 415 nm.

III. Systèmes d'expression et méthodes de désensibilisation des récepteurs

III.A. Protocoles généraux de culture cellulaire

Différents types cellulaires ont été utilisés pour étudier les paramètres de désensibilisation des récepteurs dopaminergiques de classe D_1. Nous avons employé des lignées de fibroblastes : COS-7 et COS-1 (cellules de rein de singe transformées par l'antigène T de SV40), HeLa (carcinome humain), HEK 293 (cellules embryonnaires de rein humain) et Ltk- (cellules L de souris sans thymidine kinase), et des lignées au phénotype plus proche de celui des neurones : PC12 (cellules d'un phéochromocytome de glandes surrénales de rat), MMQ (cellules provenant d'une tumeur à prolactine induite par les œstrogènes chez le rat), NG 108-15 (lignée de rat, hybride entre un neuroblastome N-18 et un gliome C6) et 13.S.1.24 (lignée immortalisée de neurones de la muqueuse olfactive de rat, Coronas *et al*., 1997).

Les lignées fibroblastiques sont cultivées dans du milieu Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) contenant du glucose à 4,5 g/l pour les cellules COS et 1 g/l pour les cellules HeLa, complété de 10% de sérum de veau fœtal (Dutscher) et de glutamine 2 mM (Life Technologies) à 37°C dans un mélange 5% CO_2/95% air. La lignée 13.S.1.24 est cultivée dans les mêmes conditions que les cellules COS avec en plus 10 μg/ml de gentamicine

pour empêcher la dérive du phénotype de la culture. Les cellules HEK 293 sont cultivées sur une base de α MEM (Life Technologies) avec 10% de sérum de veau fœtal et 2 mM de glutamine. Les lignées MMQ et PC12 sont cultivées dans du milieu RPMI (Life Technologies) contenant 10% de sérum de cheval, 5% de sérum de veau fœtal et 2 mM de glutamine. Enfin, la lignée fibroblastique Ltk- exprimant de façon stable à la fois les récepteurs A_1 de l'adénosine et D_{1A} de la dopamine (Ferré *et al.*, 1998) est cultivée dans les mêmes conditions de base que les cellules COS-7 avec en plus du pyruvate de sodium 0,11 mg/ml (Life Technologies), de la pénicilline/streptomycine 100 unités/ml (Life Technologies), et comme marqueur de sélection de l'hygromycine 300 μg/ml (Life Technologies) et la néomycine 200 μg/ml (Promega). Dans le cas des cellules HEK 293 ou PC12, leurs faibles qualités d'adhérence obligent à recouvrir les boîtes de culture de Poly-L-ornithine (PORN 1,5 μg/ml, Sigma).

III.B. Transfections et lignées stables

III.B.1. Transfection à l'aide d'agents chimiques

a. Le DEAE-Dextran

Les premières méthodes de transfection employées au laboratoire étaient fondées sur l'utilisation de complexe chimique DEAE-Dextran/ADN (Pharmacia) pour faciliter l'entrée des plasmides dans les cellules (pour revue voir Pari et Keown, 1997).

Les cellules COS-7 sont passées la veille de l'expérience au tiers, à partir d'une flasque de cellules à confluence, dans des boîtes de 10 cm de diamètre. Après un rinçage au PBS, elles sont incubées 3 heures à 37°C et 5% CO_2 en présence du mélange de transfection (DEAE-Dextran 0,5 mg/ml et 10μg d'ADN dans du DMEM). Après rinçage, les cellules sont incubées 2 heures à 37°C et 5% CO_2 en présence de chloroquine (0,1 mM dans du DMEM seul). Après un nouveau rinçage, les cellules sont cultivées dans du milieu complet avec de la pénicilline/streptomycine à 100 unités/ml pour limiter les contaminations.

b. Le fugène

Ce composé lipidique a été utilisé pour les transfections de culture primaire de neurones. Le fugène est dilué au 1/25e dans du milieu neurobasal (Life Technologies) pendant 5 minutes à température ambiante, avant d'être mélangé à 0,3 ou 0,6 μg d'ADN plasmidique. Après 15 minutes d'incubation, le mélange ADN/fugène, est déposé directement sur les cultures de neurones.

III.B.2. Transfection par électroporation

Bien plus souvent que la méthode au DEAE-dextran, nous avons employé l'électroporation qui permet de travailler facilement avec des grandes quantités de cellules et d'obtenir des résultats relativement reproductibles (pour revue voir Chang, 1997; Chu *et al.*, 1987; Herr *et al.*, 1994; Potter, 1993)

Pour les cellules COS-7, on utilise entre 2 et 4 10^6 cellules/cuve (Eurogentec) dans un volume de 300 μl de milieu complet et avec 10 μg d'ADN (à une concentration supérieure à 1 μg/μl). Pour ce type d'expérience, l'ADN est préparé à l'aide de kit d'extraction plasmidique (Promega et Qiagen). Les paramètres que nous avons déterminés comme optimaux sont 950 μF et 220 V appliqués pendant environ 30 millisecondes sur un appareil BioRad Gene Pulser II. Après l'électroporation, les cellules sont centrifugées, et le culot est mis en culture dans un milieu supplémenté en pénicilline/streptomycine à 100 unités/ml. Pour déterminer le pourcentage de transfection, des cellules COS-7 transfectées avec le plasmide pEGFP-N1 sont déposées sur des lamelles de verre, et comptées au microscope à fluorescence. Le même protocole est utilisé pour les cellules MMQ qui sont électroporées en milieu complet avec comme paramètres 950 μF et 250 V. Dans le cas de la lignée PC12, les cellules sont reprises dans du RPMI sans sérum. On utilise 3.10^6 cellules dans 300 μl avec 30 μg de plasmide avec comme paramètres 950 μF et 190 V (Herr *et al.*, 1994). Toutes les transfections sont effectuées avec comme contrôle le plasmide pcDNA3 vide (plasmide dans lequel les récepteurs de classe D_1 d'anguille ont été clonés).

III.B.3. Obtention de lignées stables

Afin de mieux contrôler le niveau d'expression des récepteurs, nous avons établi des lignées stables (Fraser, 1990) exprimant les sous-types du récepteur D_1 de la dopamine (pour revue voir Townsend-Nicholson, 1997).

Les cellules HEK 293 utilisées sont cultivées en milieu complet et détachées juste avant la confluence. On électropore $3{,}5.10^6$ cellules avec les mêmes paramètres que ceux qui sont utilisés pour les cellules COS-7. Les cellules sont ensuite déposées dans des boîtes de 10 cm de diamètre avec du milieu complet additionné de pénicilline/streptomycine (100 unités/ml) et d'un marqueur de sélection à différentes concentrations. Dans le cas de l'électroporation des récepteurs D_1 fusionnés à la GFP, le marqueur de sélection est celui du plasmide pEGFP-N1, la néomycine (G418), qui a été utilisé à deux concentrations différentes 200 et 400 μg/ml. Le milieu des cellules électroporées est changé tout les 3 jours de culture, afin de compenser la dégradation rapide de la néomycine. Lorsque les cellules arrivent à confluence au bout de

6 jours, elles sont transférées dans des boîtes de 150 cm de diamètre toujours en milieu de sélection. Après 10 jours de culture, les cellules témoins non transfectées ne survivent pas. Pour les récepteurs D_1-GFP, nous avons conservé les cellules sélectionnées à 400 μg/ml de néomycine et les cellules ont été diluées au 1/10e. Avant la congélation des 9/10° des cellules restants, on prélève 100 μl de la suspension cellulaire afin de vérifier au microscope la présence de la fluorescence.

Ces cellules prélevées sont comptées et diluées en série afin d'obtenir une concentration d'environ 0,5 cellules pour 50 μl. Une goutte de cette dilution est répartie dans chacun des puits d'une plaque de 96 puits, en ajoutant du milieu de sélection. Après 6 jours de culture, on peut alors visualiser les clones isolés au fond des puits et éliminer ceux qui ne proviennent pas d'une cellule unique. Chaque clone est alors numéroté de façon absolue en fonction de sa chronologie d'apparition. Le milieu est changé tous les 4 jours par moitié. Lorsque les clones arrivent à confluence, leur phénotype est vérifié à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence. On sélectionne ainsi les clones isolés qui expriment la chimère récepteur D_1-GFP. Chaque clone choisi est alors récupéré dans une flasque de 25 cm^2, puis à confluence transféré dans une boîte de 10 cm de diamètre. Lorsque cette boîte est à son tour confluente, une partie des cellules est congelée, une partie est conservée comme stock et le reste est utilisé pour vérifier par dosage de liaison à l'équilibre la quantité de récepteur qui s'exprime.

III.C. Les méthodes d'étude in vivo

III.C.1. Micro-injection des œufs de Medaka

Après leur prélèvement, les œufs sont déposés sur une plaque à 4°C afin de durcir le chorion et de ralentir le développement. Pendant ce temps, on prépare une boîte de Pétri remplie de milieu de Yamamoto (NaCl 17 mM, KCl 0,4 mM, $CaCl_2$ 0,27 mM, $MgSO_4$ 0,66 mM, et Bleu de Méthylène 0,004%) avec 2% d'agarose dans laquelle on forme des fentes pour retenir les œufs. Les œufs sont triés et seuls ceux des stades 1 et 2 cellules sont conservés. Afin d'éviter les infections, les œufs sont traités 5 minutes dans du ROMEIOD 2% et lavés trois fois avec du milieu de Yamamoto. Les œufs sont positionnés dans les rainures de l'agarose. Avec un capillaire étiré (Clarke, 1 mm de Diamètre externe pour 0,58 mm de diamètre interne), on perce le chorion et l'on traverse la membrane de la cellule avant d'injecter. La solution à injecter contient le plasmide à 50-100 ng/μl et 50% de Phénol Z (colorant vital pour le suivi de la micro-injection, composé de 0,2% de rouge phénol et de KCl 0,4 M). On contrôle ainsi avec ce colorant le volume injecté dans la cellule. Le lendemain les œufs qui n'ont pas survécu sont éliminés et la fluorescence GFP peut être observée.

III.C.2. Culture primaire de neurones de striatum

Pour préparer la culture, il est nécessaire de recouvrir les lamelles de verre et le fond des boîtes en plexiglas de Poly-L-ornithine (PORN, Sigma) ou de Poly-D-Lysine (Sigma). Pour les supports en plastique, la concentration de PORN est de 1,5 μg/ml, et pour les lamelles en verre, la solution doit être 10 fois plus concentrée (15 μg/ml). Les supports sont incubés avec la solution de préférence toute la nuit avec 5% CO_2 à 37°C, puis lavés trois fois avec du PBS 1X et séchés avant de les recouvrir ensuite de laminine (3 μg/ml final) au minimum 3 heures avant l'ensemencement des neurones. La laminine favorise la croissance de longs axones notamment pour les cultures de neurones relevés 3 à 5 jours après la naissance (P3-P5). Juste avant l'ensemencement, les puits contenant la laminine sont rincés.

Après décapitation d'une rate gestante et prélèvement de l'utérus, la tête de chaque embryon est prélevé dans de la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) à 4°C contenant 1 g/l de glucose (Life Technologies). Le cerveau est disséqué et les striatums sont récupérés dans du milieu HBSS froid. En aspirant l'excédent de milieu, on concentre les striatum qui sont ensuite hachés au ciseau. Les cellules sont dissociées par plusieurs va et vient dans une pipette pasteur dont l'extrémité a été rodée. Après une centrifugation de 3 minutes à 175 g, les neurones sont repris dans du milieu neurobasal (Life Technologies) additionné de glutamine 0,5 mM (Life Technologies), de pénicilline/streptomycine 10 unités/ml (Life Technologies), de 2-Mercaptoethanol 25 μM (Sigma) et de 2% du supplément B27 (Life Technologies) qui permet de réduire la croissance de la glie à moins de 0,5% de la culture. Après avoir comptabilisé le nombre de cellules présentes dans la solution, on ensemence chacun des puits avec de 3.10^5 (pour l'immunocytochimie) à 2.10^6 cellules (pour la biochimie). Tous les 3 jours le milieu de culture est changé pour moitié.

III.D. Traitements cellulaires et analyse de la désensibilisation

Après l'électroporation, les cellules sont transférées dans des plaques 24 puits et cultivées pendant 4 jours avant l'expérience de désensibilisation. La désensibilisation des récepteurs D_1 exprimés transitoirement dans les cellules, est initiée par application de dopamine (en présence d'acide ascorbique 0,1% final pour éviter sa dégradation) ou d'autres ligands pendant différents temps. Cette première étape de “prétraitement” est effectuée à 37°C après un rinçage des cellules avec du milieu préparé extemporanéement. A la fin de ce prétraitement, deux lavages avec du milieu froid, contenant du 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX), permettent d'arrêter la réaction et d'éliminer les composés présents. S'ensuie alors l'étape de “stimulation” des récepteurs pendant 15 minutes à 37°C. Cette étape est réalisée en présence d'IBMX, un inhibiteur des

phosphodiestérases qui empêche la dégradation de l'AMPc. On ajoute alors dans le milieu de l'acide chlorhydrique 0,1 N final pour extraire l'AMPc des cellules pendant une nuit. Les surnageants de culture sont récupérés le lendemain, centrifugés 10 minutes à 12000 g, et congelés avant le dosage de la quantité d'AMPc. Ce même protocole est appliqué aux lignées stables et aux cultures primaires de neurones une fois les cellules proches de la confluence.

Afin de dépléter le sérum en hormone et autres petites molécules, ce qui est nécessaire pour certains traitements, on l'incube avec du charbon actif (Sigma) et du dextran sulfate (Quantum Bioprobe) pendant 30 minutes à 56°C. Ce mélange est centrifugé 15 minutes à 3500 g et l'on recommence cette opération deux fois. Le surnageant est alors filtré sur 0,45 μm puis 0,22 μm.

IV. Immunocytochimie et observations cellulaires

IV.A. Immunocytochimie

Pour les observations morphologiques, les cellules transfectées sont transférées sur des lamelles de verres de 12 mm de diamètre au fond des puits d'une plaque 24 puits à une densité de 3.10^4 cellules par puits. Pour certains types cellulaires présentant des difficultés d'adhérence (HEK 293, PC12,…), il est nécessaire d'incuber les lamelles de verre avec de la Poly-L-ornithine (PORN, Sigma) à une concentration de 1,5 μg/ml pendant un minimum de 8 heures à 37°C. Après plusieurs lavages en PBS 1X les lamelles sont séchées avant d'y déposer les cellules. Les cellules sont alors cultivées pendant deux jours et traitées pour la désensiblisation de la même façon que lors des analyses biochimiques. Après les traitements, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS CaMg (PBS 1X à pH 7.4 contenant $CaCl_2$ 0,1 mM et $MgCl_2$ 0,1 mM) et incubées 15 minutes à température ambiante avec 3% de paraformaldéhyde diluée dans du PBS CaMg.

Lorsque l'on ne veut observer que la fluorescence de la GFP, les lamelles de verre sont lavées cinq fois 5 minutes avec du PBS CaMg, pour éliminer la paraformaldéhyde qui est autofluorescente. Puis elles sont montées sur lame avec du Mowiol (Interchim), milieu de montage qui empêche la diminution de la fluorescence. Les lames sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière en attendant leur observation. Pour effectuer des marquages immunologiques, après le lavage, les cellules sont perméabilisées et les sites non spécifiques sont saturés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de PBS CaMg avec 0,1% de Triton X100 et 10% de sérum de l'anticorps secondaire ou 0,5% de BSA. Les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant toute une nuit à 4°C dans une solution de PBS CaMg avec 0,1% de

triton, 10% de sérum de l'anticorps secondaire et 3% de BSA. Après cinq nouveaux rinçages de 5 minutes afin de limiter le bruit de fond, l'anticorps secondaire est ajouté 2 heures à température ambiante au 1/200e, dans la même solution que l'anticorps primaire, mais sans sérum. Enfin, après une dernière série de lavages, les lamelles sont montées sur lames comme précédemment.

IV.B. Observation en microscopie

Les cellules sont observées avec un microscope à fluorescence droit (Leica) et inversé (Zeiss) à différents grossissements. Pour la microscopie confocale plusieurs appareils ont été utilisés. Les cellules COS-7 ont été observées avec un Sarastro 2000 (Molecular Dynamics) équipé d'un laser argon-krypton réglé avec un gain de 3% et un diaphragme de 100 μm. Toutes les observations ont été faites avec un objectif 60x immersion à huile (Nikon). Le laser a été réglé afin que la longueur d'onde d'excitation soit de 488 nm et celle d'émission de 510 nm. Les lignées stables ont été observées avec un microscope confocal Leica avec des réglages proches dont un gain de 4% et un diaphragme de 90 μm.

IV.C. Obtention d'anticorps anti-D_1

Cette partie du travail est l'objet d'une collaboration avec le groupe de Hyman Niznik (Clarke Institute of Psychatry, Toronto). Les anticorps sont dirigés contre la région C-terminale des sous-types D_{1A}, D_{1B} et D_{1C} de Xénope (Sugamori *et al.*, 1994). Les polypeptides choisis, comprenant toute l'extrémité C-terminale à partir de la dernière tyrosine du septième domaine transmembranaire (Tyr 347), ont été fusionnés à la protéine GST (Glutathion S Transférase). Les constructions dans le vecteur pGEX (Pharmacia Biotech) ont été effectuées par Kim Sugamori. Nous avons transformé des bactéries BL21 et produit les protéines de fusion après induction à l'IPTG de la même façon que pour la production de la protéine GST-Elk. Le lysat de protéine obtenu a été purifié sur colonne de glutathion-sépharose et l'éluat obtenu a été injecté à des lapins (deux lapins par sous-types). Après le prélèvement du sérum préimmun, chaque lapin a reçu une première injection de la protéine de fusion. Un premier prélèvement a été effectué après deux rappels, puis un second après le troisième rappel, avant la saignée finale.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

L'analyse phylogénétique permet, grâce au nombre important de séquences de récepteurs D_1 d'espèces différentes clonés au laboratoire, d'avoir une idée précise de l'histoire évolutive des récepteurs chez les vertébrés. Cependant, les arbres obtenus n'offrent évidemement pas d'arguments pour justifier le maintien d'une telle diversité de sous-types au cours de l'évolution. De plus, l'absence apparente des sous-types D_{1C} et D_{1D} chez les mammifères oblige à se poser la question de leur rôle physiologique. Nous avons vu dans l'Introduction que de nombreuses propriétés pouvaient rendre compte de la diversité des récepteurs aux neurotransmetteurs, telles que leur localisation régionale et subcellulaire, leur pharmacologie, les voies de signalisation qu'ils activent et leur régulation. Mais jusqu'ici, les expériences effectuées en pharmacologie ou anatomie ne permettaient pas de discriminer avec précision les différents sous-types du récepteur D_1 (Cardinaud *et al.*, 1997; Demchyshyn *et al.*, 1995; Kapsimali *et al.*, 2000; Sugamori *et al.*, 1994). De tous les paramètres fonctionnels d'un récepteur, il est évident que le temps pendant lequel il est capable de “répondre” à un neurotransmetteur ainsi que l’intensité de cette réponse sont des éléments fondamentaux de la fonction des récepteurs. C’est la raison pour laquelle nous avons souhaité poursuivre l’étude des critères d’homologie des récepteurs D_1 chez les vertébrés par l'étude comparée de leurs mécanismes de désensibilisation.

La comparaison des alignements des séquences des sous-types du récepteur D_1 révèle la présence de résidus sérine et thréonine conservés uniquement dans certains sous-types ou pour certains groupes de récepteurs (Figure 4, résidus encadrés). Par exemple, des sérines et des thréonines présentes à la fois chez les sous-types D_{1B} et D_{1C} renforcent l’hypothèse de leur origine commune. Puisque ces résidus sont des sites potentiels de phosphorylation pour les kinases hétérologues (PKA et PKC) et homologues (GRK), il semble vraisemblable que chacun des sous-types du récepteur D_1 puisse présenter des propriétés de désensibilisation différentes. L'approche comparée de la désensibilisation doit donc permettre de dégager des caractéristiques homologues pour chacun des sous-types du récepteur D_1, ce qui aiderait à comprendre la diversité de ces récepteurs chez les vertébrés. Les deux principaux phénomènes qui interviennent lors de la désensibilisation sont d'une part le découplage fonctionnel des récepteurs de leurs voies de transduction et d'autre part la diminution du nombre de récepteurs de la surface cellulaire. Ces deux événements nécessitent des outils différents pour mesurer en biochimie les capacités de couplage des récepteurs aux voies d'activation et en cytologie la localisation des récepteurs dans la cellule au cours des phénomènes d'endocytose régulée.

Les récepteurs de la dopamine activent l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G_s. Cette activation entraîne une augmentation de la production d'AMPc par hydrolyse

de l'ATP. Nous avons utilisé ces paramètres pour analyser biochimiquement l'efficacité de l'activation des récepteurs. Le couplage quasi direct des récepteurs à l'adénylate cyclase fait que la mesure de l'activité de cette enzyme et le dosage de l'accumulation d'AMPc sont deux bons indices de la stimulation des récepteurs. Par la suite, nous avons aussi analysé la part de la voie des MAPK dans les processus d'activation des récepteurs D_1 de la dopamine. Pour suivre dans les cellules le devenir des récepteurs après activation, nous voulions disposer d'un moyen, capable de simplifier la visualisation des récepteurs aussi bien dans des modèles de cellules hétérologues que dans des systèmes plus proches de la situation naturelle. L'absence d'agoniste fluorescent pour les récepteurs de la dopamine nous a contraint à rechercher une autre méthode d'observation. Les caractéristiques techniques de la protéine fluorescente GFP devait nous permettre d'accéder à toutes ces utilisations aussi bien dynamiques qu'*in vivo*. Nous avons construit des protéines de fusion entre l'extrémité C-terminale de chacun des sous-types du récepteur D_1 et la GFP. Dans ce travail, nous avons utilisé les récepteurs D_1 de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), les premiers à avoir été clonés dans le laboratoire. L'anguille appartient au groupe des élopomorphes, un des premiers groupes divergeant des téléostéens, de ce fait, même si l'anguille possède des caractéristiques dérivées propres, elle reste un choix intéressant pour les analyses phylogénétiques chez les vertébrés. De plus, elle n'a pas été affectée par la duplication complète du génome qui a touché une partie des téléostéens comme le danio (zebrafish). Cette analyse effectuée sur des récepteurs de poissons permettra par comparaison d'extrapoler les critères d'homologies fonctionnelles découverts, à l'ensemble des vertébrés. Enfin, l'étude fonctionnelle et la détermination des propriétés conservées sont aussi nécessaires pour la classification complète des sous-types du récepteur D_1 de la dopamine.

I. Observations comparées des profils biochimiques de la désensibilisation

I.A. Mise au point des techniques d'étude

Le dosage de l'activité de l'adénylate cyclase nous est d'abord apparu comme un des meilleurs reflets de l'activation du récepteur car l'activité de l'enzyme est dosée indépendamment des facteurs cytoplasmiques capables d'influencer le taux d'AMPc mesuré. L'adénylate cyclase, directement couplée au récepteur par l'intermédiaire des protéines G_s, est donc un bon marqueur de l'état d'activation des récepteurs. Toutefois, lorsque nous avons effectués nos premiers dosages, nous avons observé que dans les cellules COS-7, l'activité de l'adénylate cyclase était proche des limites de détection de la méthode. En effet, dans chaque

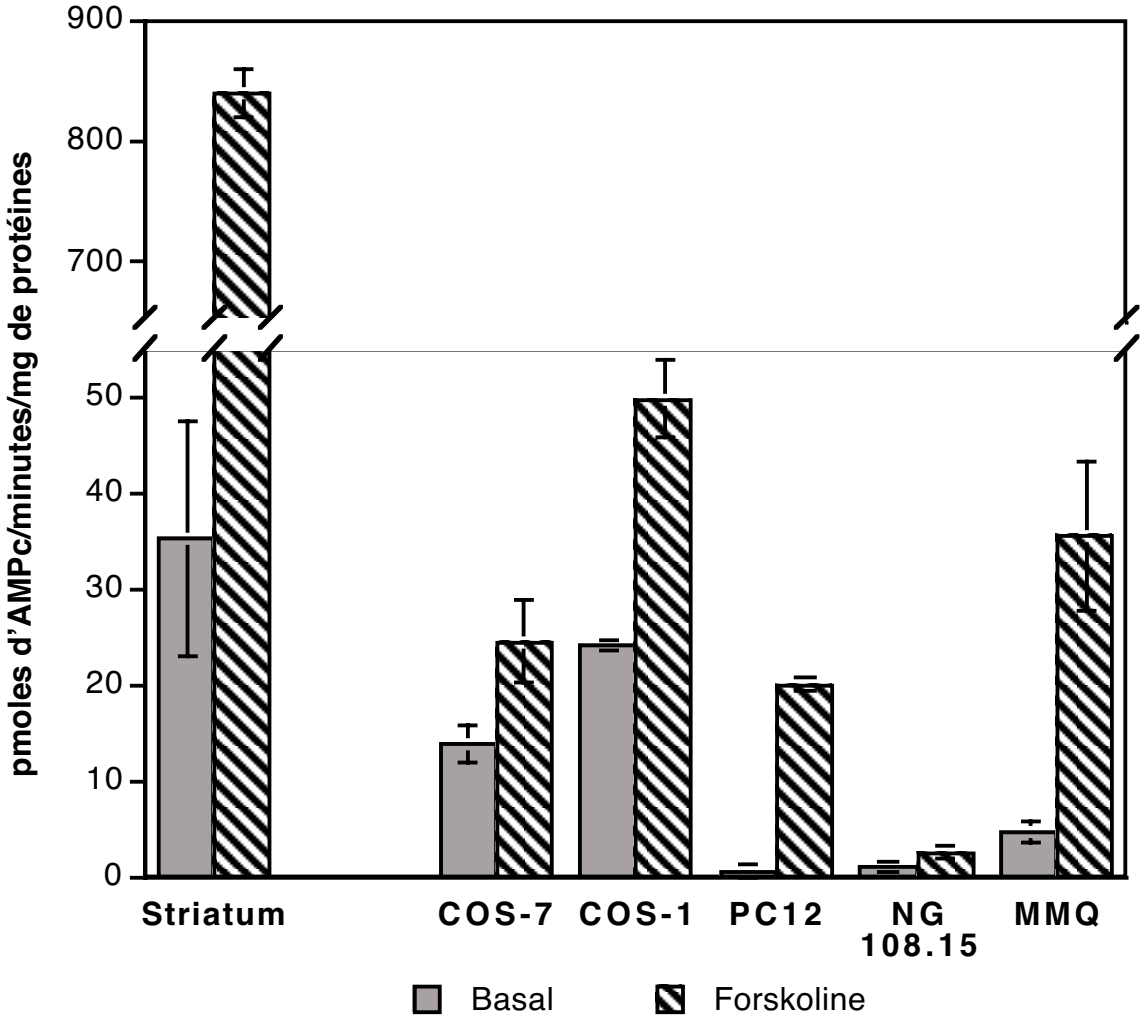


Figure 25 : Comparaison de l'activité de l'adénylate cyclase après stimulation de 30 minutes par la forskoline de différents types cellulaires.

Les membranes de plusieurs types cellulaires (COS-7, COS-1, PC12, NG 108.15 et MMQ) et de striatum de rat ont été incubées avec de la forskoline (10 μM) pendant 30 minutes. L'activité de l'adénylate cyclase a été déterminée selon le protocole décrit dans les méthodes. Ce graphique correspond à trois expériences différentes, chacune dosée deux fois. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

expérience, nous avons stimulé l'adénylate cyclase de façon maximale en utilisant la forskoline et en comparant les résultats obtenus dans les cellules à ceux de membranes de striatum de rat (Figure 25). Cette région du cerveau possède des taux élevés de récepteurs D_{1A} et d'adénylate cyclase, et la stimulation par la forskoline augmente de plus de vingt fois l'activité basale de l'enzyme, déjà très élevée. Par comparaison, la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase des cellules COS-7 ne dépasse que rarement deux fois le niveau basal. Le taux endogène de cyclase pourrait donc être plus bas dans ces cellules. Nous avons ensuite testé l'activité de l'adénylate cyclase de plusieurs autres lignées cellulaires (Figure 25). Si l'activation de l'adénylate cyclase dans les lignées PC12 ou MMQ est supérieure à celle qui est obtenue dans les cellules COS-7, elle est faible dans la lignée NG-108.15. Il est possible qu'un taux élevé d'adénylate cyclase soit incompatible avec une forte activité mitotique, les cellules PC12 se divisant par exemple beaucoup moins vite que celles de la lignée COS-7 ou NG-108.15.

Le choix d'un modèle cellulaire adéquat pour analyser la désensibilisation des récepteurs D_1 s'est alors posé. Si l'utilisation d'un type cellulaire où le dosage de l'adénylate cyclase est faible s'avérait judicieux, les cellules COS-7 possèdent d'autres avantages comme la présence en faible quantité des éléments de la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G (GRK et arrestines). Ce type cellulaire a d'ailleurs servi pour la reconstitution des phénomènes de désensibilisation du récepteur ß-adrénergique (Lorenz *et al.*, 1991). Dans un premier temps, nous avons donc décidé de poursuivre l'analyse de la désensibilisation dans ce type cellulaire. Cependant, de nouvelles difficultés ont rendu très difficile l'interprétation de l'activité des récepteurs exprimés transitoirement :

- D'une part, les résultats apparaissaient très variables, même lorsque les données obtenues étaient normalisées pour comparer les différentes expériences entre elles. L'activité de l'adénylate cyclase est exprimée en pmoles d'AMPc formées par minute et par mg de protéines et les taux de transfection sont comparés grâce aux dosages des récepteurs par liaison de ligands.
- D'autre part, lors de la stimulation maximale des récepteurs par la dopamine, les valeurs d'activation de l'adénylate cyclase restent très faibles. Un des facteurs qui peut contribuer à ces faibles valeurs est le taux insuffisant de cellules transfectées (20-30%) par les méthodes chimiques utilisées au départ de notre étude. Grâce à la technique de l'électroporation nous avons réussi, par la suite, à obtenir avec les cellules COS-7 des taux de transfection proches de 80% de façon courante et reproductible.

En conclusion, il semblait que le dosage de l'activité de l'adénylate cyclase ne soit pas la méthode de choix pour étudier la désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7. C'est pour cette raison que nous avons donc préféré doser l'accumulation d'AMPc, ce qui techniquement est moins lourd, et qui devait nous permettre de s'affranchir d'une partie des

problèmes que nous venons de décrire. Le dosage que nous avons utilisé, repose sur le même principe de compétition que les dosages immunologiques utilisés par les kits commerciaux. Cette technique tire le bénéfice de la très forte affinité de la PKA pour l'AMPc (Nordstedt et Fredholm, 1990). Elle est plus sensible que la mesure de l'activité de l'adénylate cyclase, la gamme étalon s'étendant de 0,125 à 8 pmoles d'AMPc (Figure 24). L'utilisation de ^{3}H-AMPc comme traceur introduit un facteur de variabilité supplémentaire dans l'expérience, qui est probablement dû à son instabilité.

Nous avons donc choisi les cellules COS-7 pour la multiplicité des approches qui y sont possibles. L'accumulation d'AMPc obtenue après stimulation des récepteurs D_1 avec la dopamine est suffisante et cette lignée présente une morphologie compatible avec l'étude de la biologie cellulaire des récepteurs. Ce type cellulaire possède un cytoplasme beaucoup plus étalé que les autres cellules classiques dans lesquelles les récepteurs D_1 ont été étudiés comme les cellules Sf9 (Ng *et al.*, 1995). En outre, les cellules COS-7 expriment le récepteur $ß_2$-adrénergique (c'est pour cette raison que nous utilisons systématiquement dans nos expériences le propranolol pour bloquer les récepteurs $ß_2$-adrénergiques) et on peut donc penser que les composants cellulaire classique de la désensibilisation sont présents dans ces lignées. A la différence des cellules COS-1 (Steffey *et al.*, 1991), aucune accumulation d'AMPc n'est observée après un traitement avec de la dopamine si les cellules ne sont pas transfectées par les récepteurs D_1. Dans tous les cas, même dans les cellules COS-1, le taux d'expression des récepteurs est suffisamment faible pour qu'aucune liaison spécifique ne soit détectable avec le SCH-23390 tritié (Steffey *et al.*, 1991). Enfin, grâce à ces cellules fibroblastiques, nous pouvions tester nos méthodes avant de les appliquer à des cellules neuronales, et disposer ainsi d'un modèle d'étude de la désensibilisation.

Au cours de l'analyse de la désensibilisation des récepteurs D_1 que nous avons effectuée, nous avons utilisé l'apomorphine, agoniste dopaminergique, pour effectuer les prétraitements des cellules. Nous voulions éviter les problèmes de stabilité de la dopamine dans les milieux de culture (Marien *et al.*, 1984), cette dernière ayant tendance à se dégrader rapidement, même si la présence d'un antioxydant réduit cette dégradation. En outre, il a été montré que la dopamine ou ces produits de dégradation induisent des phénomènes d'apoptose et de toxicité dans certains types cellulaires, en particulier dans les cellules 13.S.1.24 que nous avons utilisé (Coronas *et al.*, 1997). Dans ces conditions, il était nécessaire de remplacer le ligand naturel par un composé provoquant moins d'inconvénient. L'apomorphine est un agoniste puissant des récepteurs D_1 de la dopamine même si des études comparatives indiquent qu'aucune corrélation ne semble possible entre l'ordre de puissance d'activation de l'agoniste (partiel ou total) et sa faculté à entraîner une désensibilisation (Lewis *et al.*, 1998). De même, pour plusieurs membres de la famille des agonistes SKF, aucune relation n'a pu être démontrée entre l'efficacité à stimuler

l'adénylate cyclase et l'induction de comportements rotatoires et stéréotypés chez le rat (Arnt *et al.*, 1992). La notion d'agonisme partiel est donc dépendante du modèle expérimental utilisé. Mais surtout, la particularité la plus intéressante de l'apomorphine, est que, contrairement à la dopamine, elle n'est pas capable de discriminer chacun des sous-types du récepteur D_1 (Figure 40). Comme nous voulons comparer les facultés de désensibilisation de chaque sous-type, il est important de s'affranchir des variations possibles d'affinité du composé employé dans ce but.

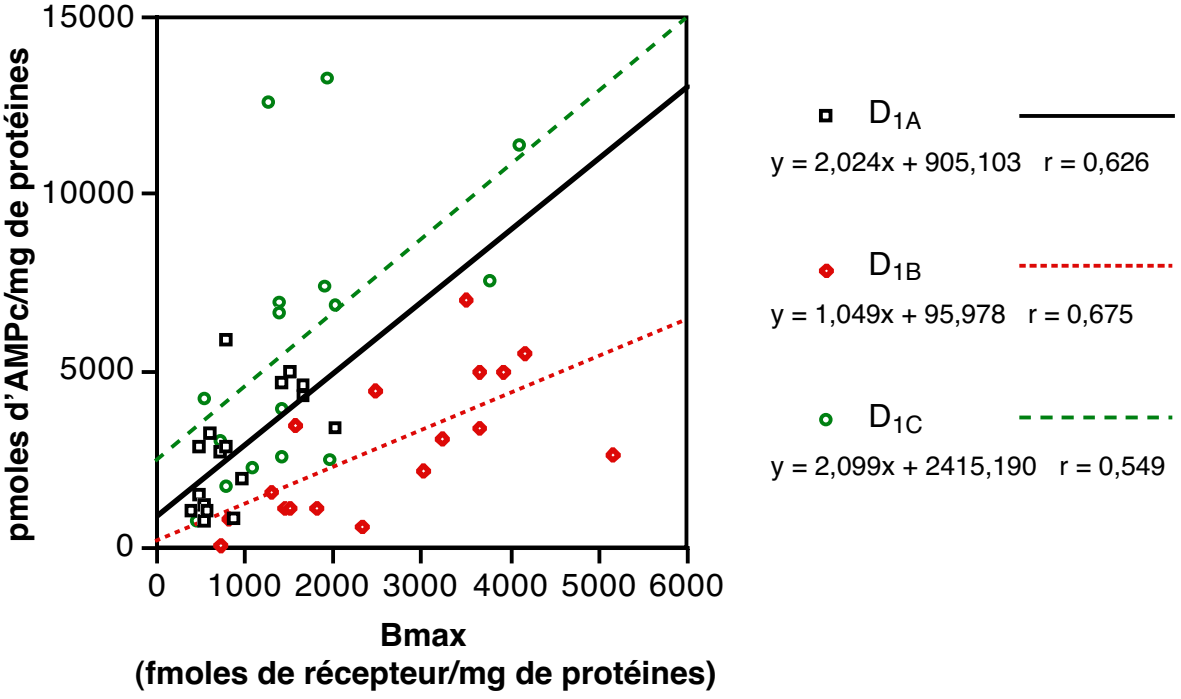


Figure 26 : Comparaison des quantités d'AMPc obtenues lors des dosages d'accumulation après stimulation des récepteurs, en fonction du taux d'expression du récepteur mesuré par le Bmax.

Sur ce schéma sont récapitulés tous les couples Stimulation/Bmax obtenus lors des transfections transitoires des cellules COS-7 par les récepteurs. Ces données regroupent tous les dosages des taux d'AMPc. Les droites de corrélations ont été calculées pour chaque sous-type de récepteur D_1 et les équations obtenues sont indiquées à côté des graphiques correspondants, avec leur coefficient de corrélation.

Enfin, il semble que la quantité de récepteurs qui s'exprime dans une cellule ait une influence sur les capacités de désensibilisation de ceux-ci (Spurney, 1998). Des lignées exprimant des taux faibles (de 250 à 500 fmoles/mg de protéines) ou élevés (de 2500 à 4000 fmoles/mg de protéines) de récepteurs A_2 de la thromboxane montrent que la désensibilisation homologue est atténuée dans les lignées exprimant les plus forts taux de récepteurs. Pour cette raison, nous avons essayé de nous placer, autant que possible, dans des conditions où les taux de récepteurs exprimés n'étaient pas trop élevés. Dans tout les cas, comme les valeurs finales

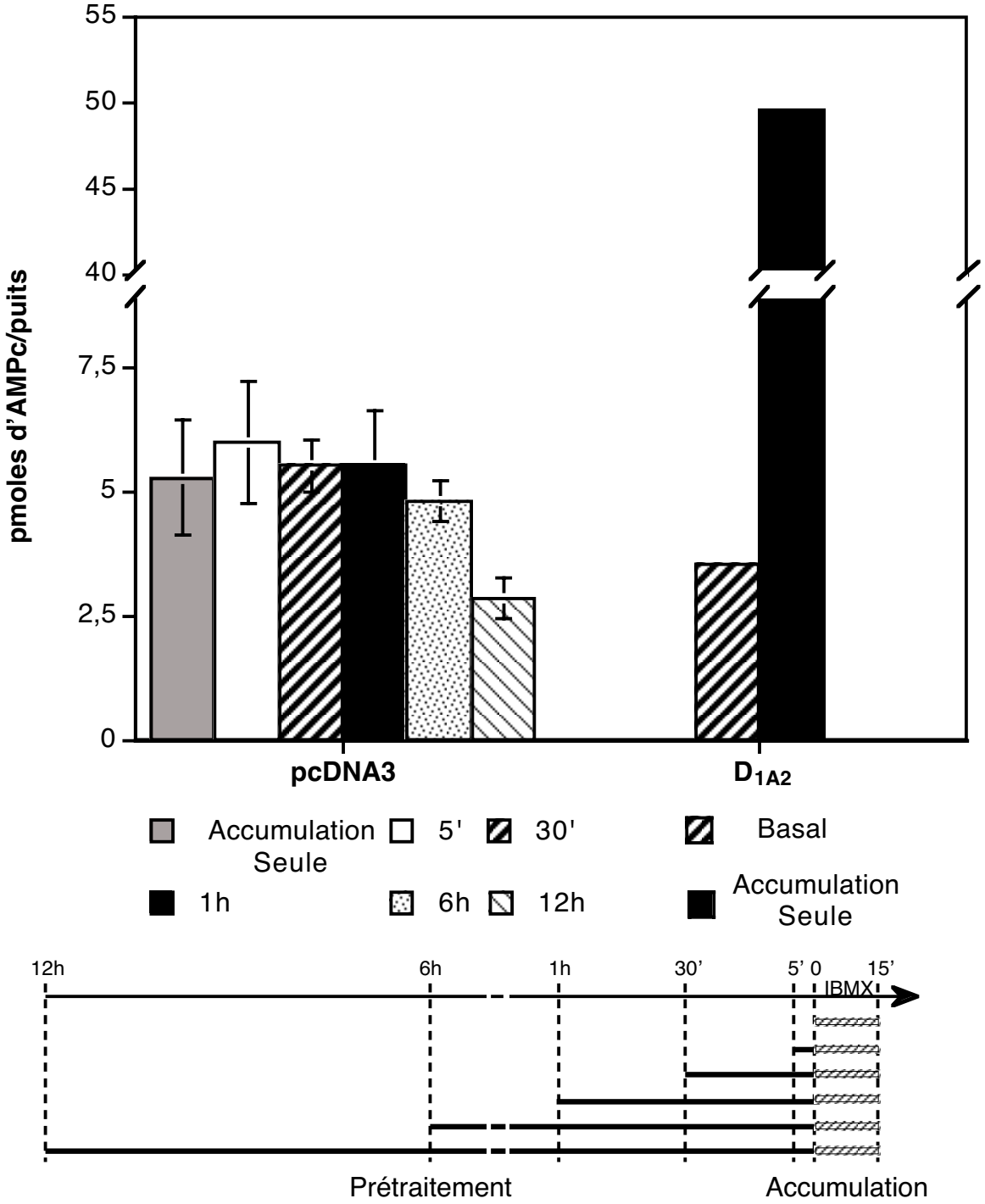


Figure 27 : Variations d'accumulation d'AMPc dans les cellules COS-7 sans récepteurs D_1.

Les cellules COS-7 transfectées par le plasmide vide pcDNA3, ont été traitées avec de l'apomorphine 10 μM, du CGS-15943 10 μM et du propranolol 10 μM pendant les temps indiqués en dessous du graphique. L'accumulation d'AMPc a été effectuée pendant 15 minutes en présence de dopamine 10 μM, de CGS-15943 10 μM, de propranolol 10 μM et d'IBMX 0,5 mM. La stimulation maximale correspond à des cellules non prétraitées. Les mesures des taux d'AMPc ont été divisées par la quantité de protéines contenues dans chaque puits (mg) et le taux de récepteurs exprimés (Bmax). A titre de comparaison, les valeurs obtenues lorsque le récepteur D_{1A2} est transfecté dans les cellules COS-7 sont données avec (stimulation maximale) ou sans (basal) stimulation de 15 minutes à la dopamine (10 μM). Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type, sauf pour le récepteur D_{1A2}, où les valeurs sont données à titre indicatif.

d'accumulation d'AMPc prennent en compte le taux d'expression des récepteurs, nos mesures s'affranchissent de ces variations. Nous avons effectué une corrélation entre les valeurs de l'accumulation maximale et les taux d'expression des récepteurs (Bmax) afin de vérifier que ces derniers n'entraînaient pas de biais de calculs ou de mesures (Figure 26). Par la suite nous avons éliminé les valeurs dosées qui s'éloignent trop de la droite de corrélation.

I.B. Analyses des profils de désensibilisations des récepteurs D_1 dans les cellules transfectées

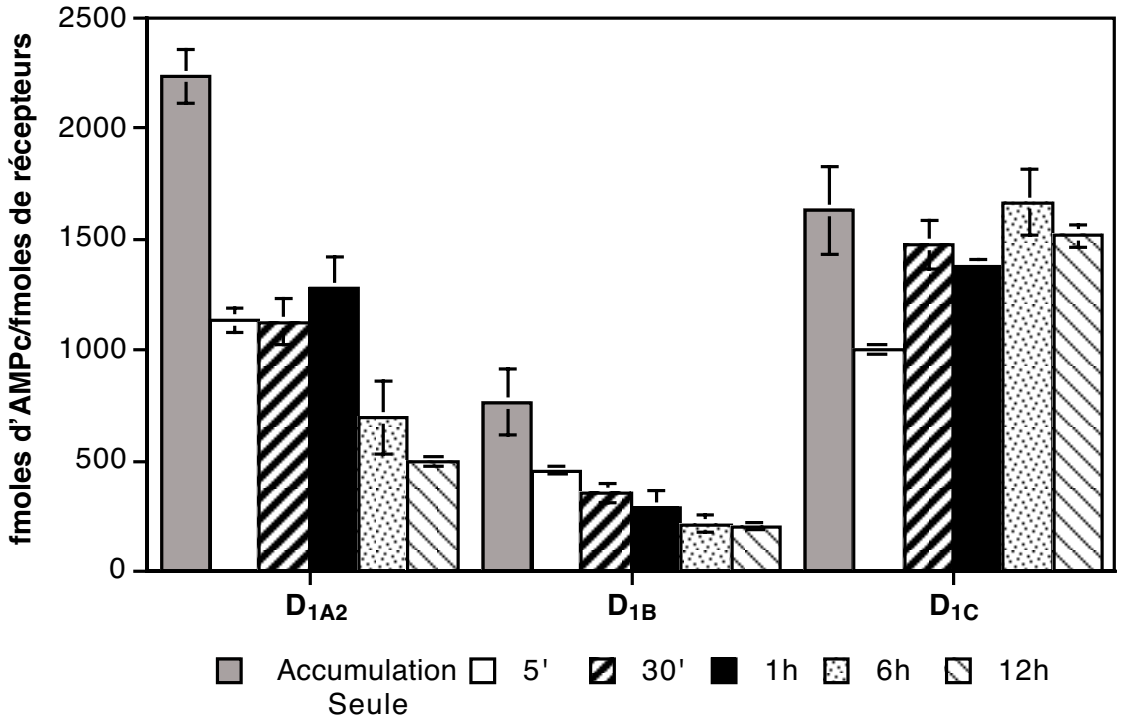


Figure 28 : Profil de désensibilisation des sous-types du récepteur D_1 dans les cellules COS-7.

Les cellules transfectées par chacun des sous-types du récepteur D_1 ont été traitées comme pour la Figure 27 pendant les temps indiqués ci-dessus. Ce graphique est la moyenne de huit expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

L'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc est directement représentative de l'activation de l'adénylate cyclase dépendante des récepteurs D_1. Pour cette raison, les taux d'AMPc reflètent fidèlement la désensibilisation qui apparaît après une exposition prolongée aux agonistes des récepteurs D_1. Nous avons dans un premier temps vérifié que les cellules COS-7 transfectées avec le vecteur d'expression non recombinant (pcDNA3) ne répondaient pas à l'agoniste dopaminergique apomorphine (10 μM) utilisé dans nos expériences (Figure 27). Après

15 minutes d'exposition, l'accumulation maximale d'AMPc est de 5,28 (±1,16) pmoles/puits alors qu'elle atteint 93,95 (±5,18) dans les cellules où les récepteurs D_{1A2} s'expriment de façon spécifique (0,55 pmoles/mg de protéines). En fait, le niveau maximal d'AMPc obtenu dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3 est proche du niveau basal mesuré dans les cellules transfectées avec le récepteur D_{1A2}. Finalement, même après 6 heures d'exposition à l'apomorphine, les cellules témoins répondent à l'agoniste de la même façon qu'après 15 minutes d'exposition, ce qui montre que les effets observés dans les cellules transfectées par les récepteurs D_1 sont bien spécifiques de la présence des récepteurs exogènes.

La mesure des profils d'accumulation d'AMPc dans les cellules COS-7 transfectées après exposition à l'apomorphine (10 μM) à différents temps, permet de décrire les profils de désensibilisation des trois sous-types du récepteur D_1 étudiés (Figure 28).

Pour le récepteur D_{1A2}, la diminution maximale d'activité apparaît dans les 5 premières minutes d'exposition à l'agoniste. Cette chute de 50% de l'accumulation d'AMPc se maintient jusqu'à une heure de traitement. Ensuite, une faible remontée des niveaux d'AMPc s'opère, juste avant une nouvelle diminution importante. En conséquence, après 6 heures de traitement, on atteint une baisse de 75% de l'accumulation de l'AMPc par rapport à celle des cellules qui n'ont pas été prétraitées. Lorsque l'on regarde le profil d'accumulation d'AMPc provoqué par l'activation du récepteur D_{1B} (Figure 28), la première chose remarquable est que le profil d'accumulation des taux d'AMPc est globalement plus bas que pour le récepteur D_{1A2}. En effet, la stimulation maximale du récepteur D_{1B} est deux fois et demie plus basse que celle qui est obtenue avec le récepteur D_{1A2}. Cependant, malgré cette accumulation plus faible d'AMPc, le profil de désensibilisation est très semblable à celui du récepteur D_{1A2}. Dès les 5 premières minutes, on retrouve 40% de désensibilisation par rapport à l'activation maximale. Le niveau d'AMPc reste également à peu près stable jusqu'à une heure d'exposition à l'apomorphine. A ce moment, une nouvelle baisse apparaît qui atteint également 75%. Toutefois, le rebond constaté pour le récepteur D_{1A2} n'est pas clairement observé pour le récepteur D_{1B}. Enfin, en ce qui concerne le récepteur D_{1C}, dont le gène n'a pas été trouvé pour le moment chez les mammifères, la stimulation maximale d'AMPc obtenue avec 10 μM d'apomorphine donne des valeurs générales juste un peu plus basses que celles du sous-type D_{1A2}. Mais, le résultat le plus étonnant est qu'après 12 heures d'exposition à l'apomorphine, aucune diminution dans l'accumulation d'AMPc n'est observée. De façon intéressante, une faible baisse des taux d'AMPc après 5 minutes de stimulation est constatée, mais ce phénomène n'est plus présent dès 30 minutes de traitement et aucune autre modification significative n'est plus observée au cours de plus longues périodes de traitement.

I.C. Rôle de l'adénylate cyclase dans les phénomènes de désensibilisation des récepteurs D_1

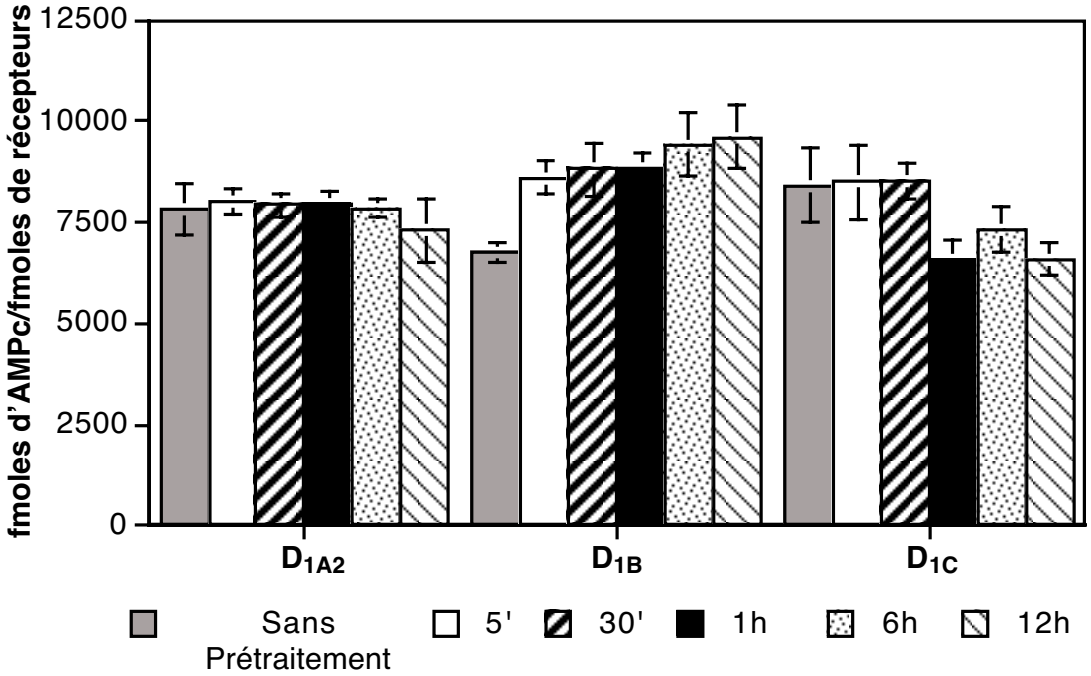


Figure 29 : La régulation de l'adénylate cyclase lors de la désensibilisation des récepteurs D_1.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que précédemment (Figure 27). Les cellules transfectées sont prétraitées comme pour la Figure 27, mais la phase d'accumulation est effectuée en présence de forskoline 10 μM à la place de la dopamine. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

Afin de vérifier que l'activité de l'adénylate cyclase elle-même n'est pas modifiée au cours de ces traitements avec l'apomorphine, nous avons mesuré les niveaux d'AMPc atteints par une stimulation des cellules à la forskoline (10 μM) après traitement des cellules à l'apomorphine, pendant les mêmes durées que celles qui sont utilisées pour la stimulation des récepteurs D_1 (Figure 29). En regardant le profil obtenu, aucune diminution significative dans l'accumulation d'AMPc induite par la forskoline n'est observée pour aucune des cellules transfectées par les sous-types du récepteur D_1. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de désensibilisation de l'adénylate cyclase quand les récepteurs D_1 sont stimulés avec l'apomorphine, et cette enzyme est donc toujours pleinement capable de répondre à l'activation par les récepteurs D_1. La forskoline agit sur tous les types d'adénylate cyclase sauf le type IX (pour revue voir Hurley, 1999). Le site d'action est très restreint et hydrophobe et n'entre pas en compétition avec les protéines G (pour

revue voir (Sunahara *et al.*, 1996). En effet, la fixation de la forskoline n'a pas lieu au même endroit que la protéine $G_{\alpha s}$, même si les deux sites de liaisons sont proches dans les boucles intracytoplasmiques de l'adénylate cyclase (Dessauer *et al.*, 1997). Cependant, l'absence de la sous-unité α de la protéine G diminue de façon importante l'affinité de la forskoline pour l'adénylate cyclase. Ces observations ont deux implications, la première, pratique, est qu'il est très difficile de retirer la forskoline du milieu lorsqu'elle a agi sur l'adénylate cyclase, la seconde, est que ce produit reste un bon activateur de la cyclase dans notre cas puisqu'elle n'entre pas en compétition avec le site de fixation des protéines G.

I.D. Les interactions entre la stimulation de l'adénylate cyclase et celle des récepteurs D_1

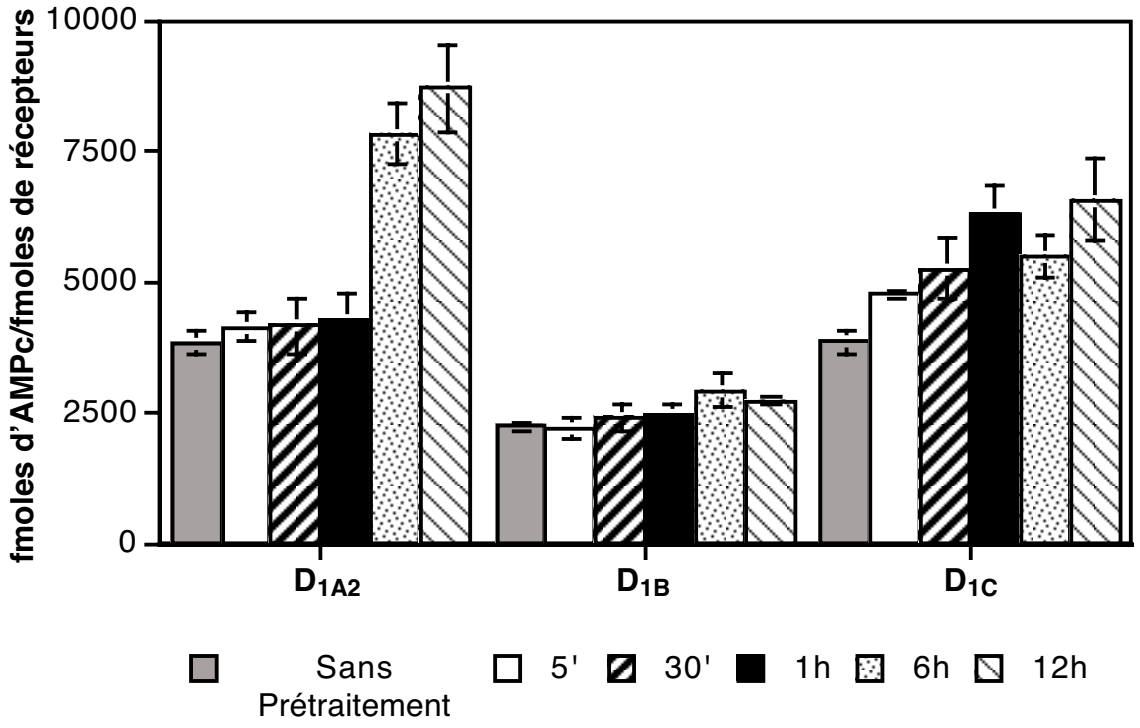


Figure 30 : Interaction entre les voies de régulations de l'adénylate cyclase et des récepteurs D_1.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que précédemment (Figure 27). Les cellules sont prétraitées avec de la forskoline 10 μM mais la phase de stimulation utilise la dopamine comme pour la Figure 27. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

Malgré les restrictions que nous venons de faire vis-à-vis de l'utilisation de la forskoline, nous avons, par curiosité, observer l'effet de l'action prolongée de ce composé sur l'activité de l'adénylate cyclase. Si l'on applique le prétraitement avec de la forskoline (10 μM) et que l'on effectue la stimulation avec de la dopamine comme pour les expériences de désensibilisations (Figure 30), on remarque une augmentation de l'accumulation d'AMPc au cours du temps. Les profils sont un peu différents en fonction des sous-types. En effet, si l'augmentation des taux d'AMPc est très nette après 6 heures de traitement dans le cas du récepteur D_{1A2} (deux fois la valeur de l'activation maximale), l'augmentation est plus douce pour les cellules transfectées avec le récepteur D_{1C} et quasiment inexistante avec le sous-type D_{1B}. Ces résultats montrent d'abord qu'il n'y a pas de modifications des capacités de stimulation de l'adénylate cyclase après un traitement de longue durée à la forskoline, ce qui suggère qu'il n'y a pas de désensibilisation de cette enzyme. Il avait été montré que l'adénylate cyclase pouvait se désensibiliser sous l'action de la phosphorylation par la PKA, elle même activée par l'augmentation des taux d'AMPc (Iwami *et al*., 1995; Premont *et al*., 1992). Toutes ces expériences ont lieu *in vitro* par l'addition de la sous-unité catalytique de la PKA ou de sous-unités G_s purifiées. Il se pourrait donc que ces tests ne soient pas représentatifs des conditions réelles de la désensibilisation dans les cellules.

L'effet des récepteurs activés sur l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline est plus difficile à interpréter. Tous les effets observés surviennent après des traitements prolongés à la forskoline. Il est vraisemblable que pour les temps plus court, la stimulation de l'adénylate cyclase provoquée par la forskoline soit maximale, et que l'effet des récepteurs ne puisse pas être examiné dans ces conditions. En revanche, l'observation d'une stimulation aux temps longs telle qu'elle est observée pour les récepteurs D_{1A2} et D_{1C} , suggère que des mécanismes de régulation surviennent sous l'effet des traitements prolongés à la forskoline, en particulier, que l'adénylate cyclase devienne plus sensible à l'action de la sous-unité $G\alpha_s$. Il est difficile d'avancer une hypothèse pour rendre compte de cet effet sans analyses complémentaires. L'absence d'effet du récepteur D_{1B} est très frappante. Une interprétation possible serait que l'activité constitutive du récepteur empêche les mécansimes de régulation à long terme d'apparaître.

I.E. La désensibilisation des récepteurs dans d'autres types cellulaires

Pour utiliser des profils de désensibilisation afin de discriminer les sous-types du récepteur D_1 chez les vertébrés, il faut montrer qu'ils ne sont pas dépendants du type cellulaire, et nous avons choisi de le vérifier en utilisant une lignée dont les caractéristiques sont plus proche des neurones. En effet, il est toujours possible que les phénomènes de désensibilisation que nous venons d'observer soient spécifiques des lignées fibroblastiques. Nous avons donc utilisé une

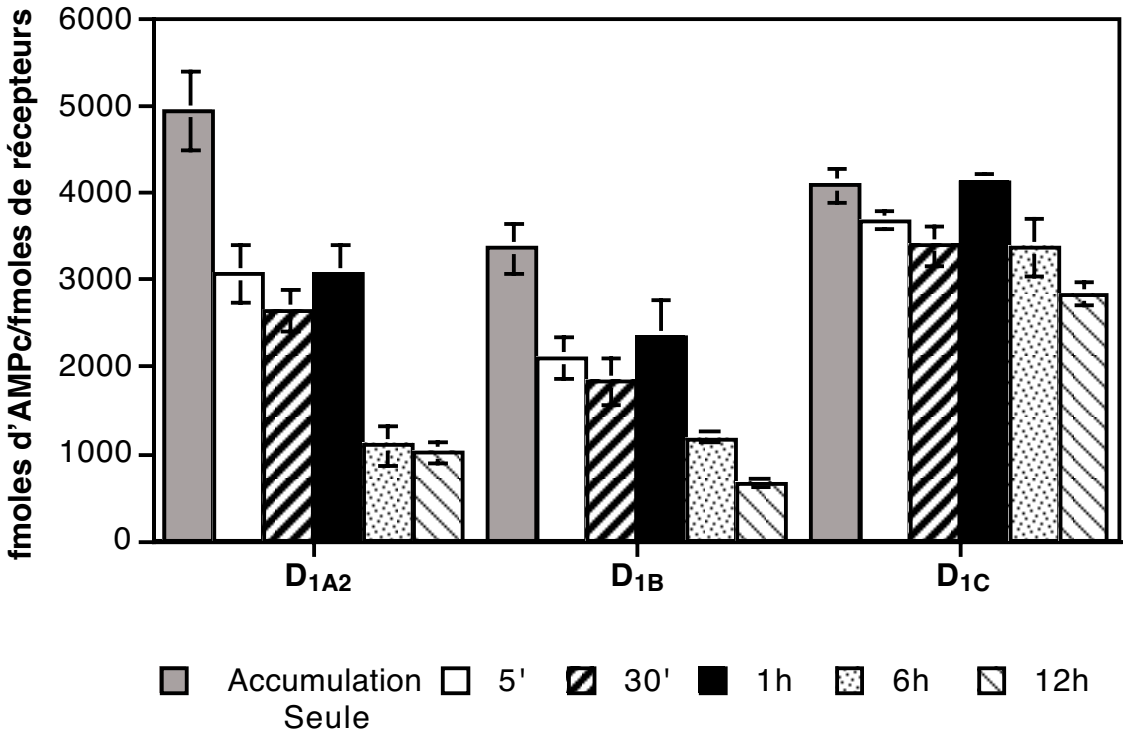


Figure 31 : Profils de désensibilisation des récepteurs sauvages D_1 dans les cellules de muqueuse olfactive 13.S.1.24.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour la Figure 27. Les récepteurs sauvages d'anguille sont exprimés de façon transitoire dans les cellules 13.S.1.24. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

lignée neuronale dérivée de cellules de la muqueuse olfactive du rat, transformée par l'oncogène T du virus SV40 : les cellules 13.S.1.24 (Coronas *et al.*, 1997). Dans ce type cellulaire, les niveaux d'accumulation maximum d'AMPc sont deux fois plus élevés que dans les cellules COS-7 après expression des sous-types du récepteur D_1. Cependant, les observations effectuées dans ces cellules sont très proches de celles qui sont obtenues dans les lignées fibroblastiques COS-7 (Figure 31). Les deux phases du processus de désensibilisation sont constatées pour les récepteurs D_{1A2} et D_{1B}. On retrouve en effet une première baisse importante de l'accumulation de l'AMPc dans les premières minutes de traitement à l'apomorphine, et après une heure, une nouvelle baisse est observée. En outre, les taux globaux d'accumulation d'AMPc sont plus faibles pour le récepteur D_{1B} que pour le récepteur D_{1A2}. Enfin, pour le sous-type D_{1C}, aucun phénomène de désensibilisation n'a pu être mis en évidence. En conclusion, dans un type cellulaire plus "neuronal", les comportements de désensibilisation sont essentiellement les mêmes que dans les

cellules fibroblastiques. Il semble donc que les propriétés de désensibilisation que nous venons de décrire pour les récepteurs D_1 ne dépendent pas du type cellulaire étudié. Il est alors possible de comparer ces résultats avec confiance à ceux qui sont obtenus dans les autres espèces de vertébrés. Les différents profils de désensiblisation observés représentent donc un caractère homologue fonctionnel discriminant les différents sous-types du récepteur D_1.

I.F. Détermination des séquences spécifiques de la désensibilisation des récepteurs D_1

I.F.1. Utilisation de chimères des sous-types de récepteurs D_1

La majorité des travaux sur l'analyse des séquences des récepteurs impliqués dans les phénomènes de désensibilisation indiquent que la région C-terminale porte les structures nécessaires au déroulement des phénomènes de désensibilisation (Hausdorff *et al.*, 1990). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé, en collaboration avec le groupe de Hyman NIZNIK au Canada, des chimères dans lesquelles les extrémités C-terminales de chaque sous-type ont été interchangées (Sugamori *et al.*, 1998b). Dans ces chimères, construites par Kim SUGAMORI, les extrémités C-terminales de chaque sous-type du récepteur D_1 de xénope sont échangées après le 7ème segment transmembranaire. Les chimères effectuées entre les récepteurs D_{1A} et D_{1C} n'ont pas de profils de liaison des agonistes différents des formes sauvages. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à obtenir au laboratoire une chimère $D_{1A}/D_{1B\ C\text{-}ter}$ qui s'exprime à des taux significativement plus élevés que le niveau de base dans les cellules transfectées. Néanmoins, la chimère inverse $D_{1B}/D_{1A\ C\text{-}ter}$ est parfaitement fonctionnelle et montre un profil de désensibilisation clair. De façon intéressante, ce profil ne ressemble ni à celui du D_{1A}, ni à celui du D_{1B} (Figure 32). Si la baisse globale de l'accumulation d'AMPc est de 70%, les deux phases de diminution ne sont pas aussi marquées avec cette chimère que dans les profils seuls du D_{1A} ou du D_{1B}. Il faut tout de même noter que l'intensité de la désensibilisation ressemble plus à celle du récepteur D_{1A} qu'à celle du récepteur D_{1B}.

Si l'on regarde les chimères des récepteurs D_{1A} et D_{1C}, on observe des profils nettement différents. D'abord, avec l'extrémité C-terminale du récepteur D_{1C}, le récepteur D_{1A} ne se désensibilise pas puisque le niveau d'accumulation d'AMPc après 12 heures d'exposition à l'apomorphine est toujours proche du niveau d'accumulation maximale. Par contre, lorsque le récepteur D_{1C} possède l'extrémité C-terminale du récepteur D_{1A}, la diminution d'AMPc est de 40%. Cependant, le profil de désensibilisation de la chimère $D_{1C}/D_{1A\ C\text{-}ter}$ n'est pas non plus celui du récepteur D_{1A} seul. Ces résultats suggèrent que si la séquence de la région C-terminale joue un

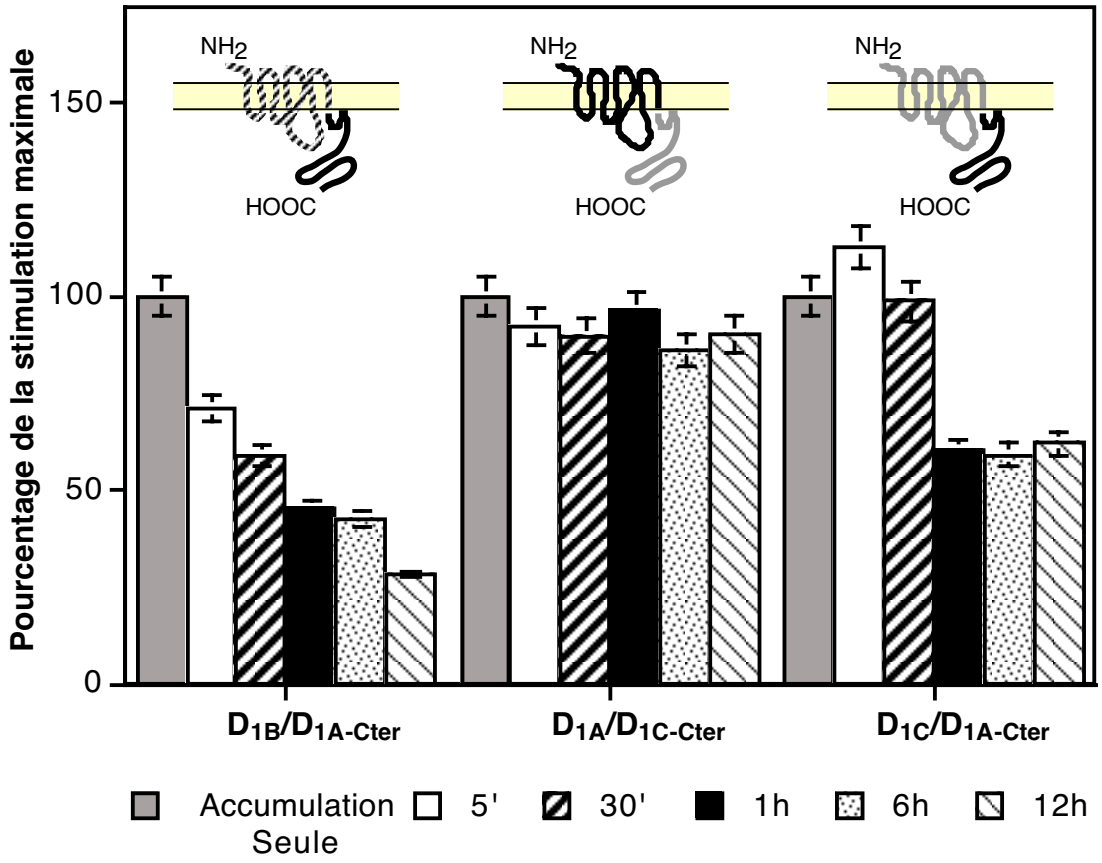


Figure 32 : Profils de désensibilisation pour les chimères de récepteur D_1 dans lesquelles les séquences C-terminales ont été interchangées.

Les expériences de désensibilisation ont été réalisées avec de l'apomorphine utilisé pendant les temps indiqués, et la stimulation de l'adénylate cyclase a été faite par la dopamine comme pour la Figure 27. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec les chimères construites à partir des séquences de xénope. Les valeurs d'AMPc ont été divisées par la quantité de protéines dans chaque puits et les données obtenues sont exprimées en pourcentage de la stimulation maximale. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

rôle sur les caractérisitiques de désensibilisation des récepteurs D_1, elle n'est pas suffisante pour expliquer toutes les particularités de ce phénomène.

I.F.2. Rôle de la PKA sur le profil de désensibilisation des récepteurs D_1

Afin d'analyser plus en détail la part des désensibilisations homologue et hétérologue sur le profil de désensibilisation des récepteurs D_1, nous avons utilisé un inhibiteur de la PKA, le H89 (Figure 33, Chijiwa *et al.*, 1990). Après ce traitement au H89, on ne remarque aucune diminution de l'accumulation d'AMPc caractéristique de la désensibilisation des récepteurs lors de la première heure de traitement. On observe uniquement une baisse globale autour de 25% après 6 heures de stimulation par l'agoniste, qui affecte tous les sous-types du récepteur D_1. Cette baisse pourrait correspondre à un ralentissement considérable de la désensibilisation qui rappelle ce qui est observé pour les mutants des sites de phosphorylation de la région C-terminale de la PKA (Sibley *et al.*, 1998). Il semble en tout cas que l'intervention des kinases “hétérologues” comme la PKA soit plus importante que l'on ne l'imagine.

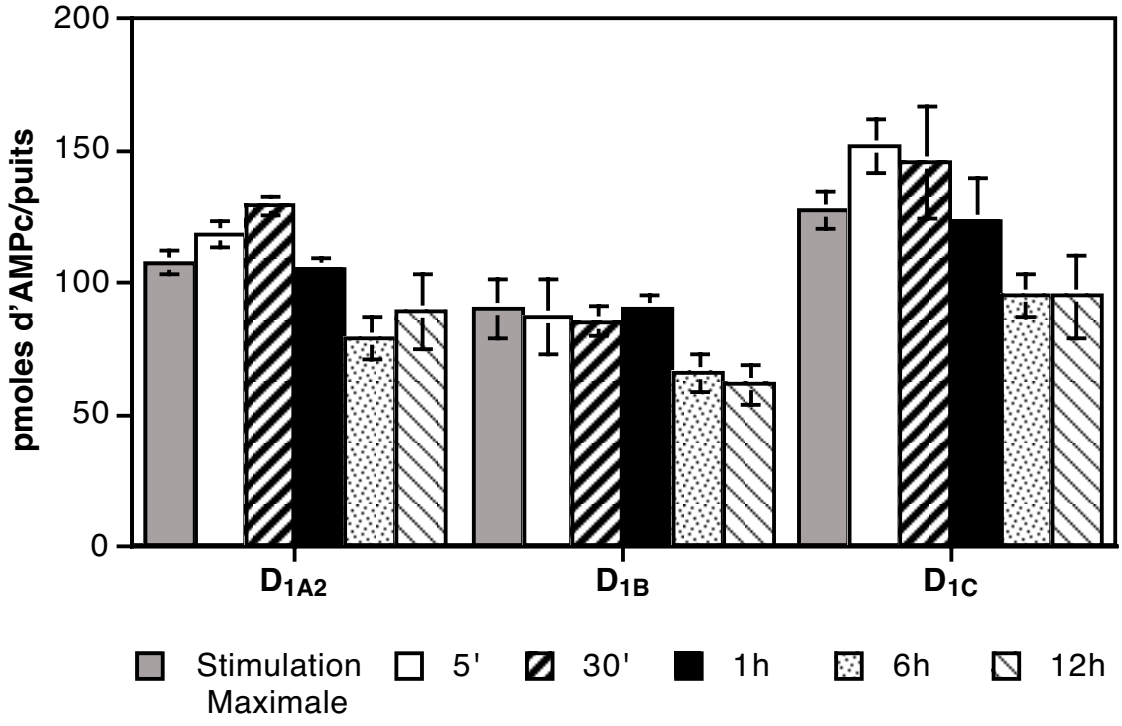


Figure 33 : Interventions des inhibiteurs de la PKA sur la désensibilisation des récepteurs D_1.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que précédemment (Figure 27). Les cellules COS-7 transfectées par les récepteurs D_1 sont prétraitées comme pour la Figure 27, l'incubation avec un inhibiteur de la PKA, le H89 à 10 μM, commençant 30 minutes avant le prétraitement. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

En conclusion, les analyses des profils d'accumulation de l'AMPc font de la désensiblisation, un critère d'homologie fonctionnel discriminant. En effet, le récepteur D_{1A} se caractérise par un profil biphasique aboutissant à une forte baisse de l'accumulation d'AMPc. Le récepteur D_{1B} possède un profil proche mais avec une amplitude plus faible, et le récepteur D_{1C} ne semble pas susceptible de se désensibiliser.

II. Étude de l'intervention de l'état cellulaire sur la fonction des récepteurs

II.A. Observations des interactions avec les récepteurs de l'adénosine

Lors de nos premières tentatives d'analyse de la désensibilisation, nous n'avions pas constaté une baisse du taux d'accumulation de l'AMPc pour les récepteurs D_{1A2} dans les cellules COS-7 transfectées (Figure 34A). Le milieu de prétraitement contenait de l'apomorphine (10 μM) et du propranolol afin d'éviter que l'apomorphine n'active les récepteurs $ß_2$-adrénergiques présents dans les cellules COS-7. Dans ces conditions, le taux d'accumulation d'AMPc après 12 heures de traitement est identique à celui des cellules sans prétraitement. Par contre pour le récepteur D_{1B}, cette absence de désensibilisation n'etait pas observée et l'on retrouvait un niveau général d'accumulation de l'AMPc plus bas que celui du récepteur D_{1A2}, et une baisse plus progressive de l'accumulation de l'AMPc qui atteint 45% de la stimulation maximale de ces récepteurs après 12 heures d'exposition à l'apomorphine.

A la suite d'observations déjà faites au laboratoire (Salim *et al.*, 2000), de communications personnelles du groupe d'Emmanuel MOYSE et de recherches dans la littérature, l'existence d'une interaction inhibitrice entre les récepteurs de l'adénosine et ceux de la dopamine pouvait être une explication possible à cette absence de désensibilisation. Nous avons donc testé plusieurs composés intervenant sur les récepteurs de l'adénosine. En utilisant le CGS-15943, un antagoniste des récepteurs A_1 de l'adénosine, ajouté au milieu de prétraitement déjà décrit, nous avons alors obtenu des profils de désensibilisation pour les sous-types du récepteur D_1 décrits dans le chapître précédent (Figure 34B).

Nous avons voulu comprendre un peu mieux comment les récepteurs de l'adénosine pouvaient affecter la régulation des récepteurs D_1. Lorsque l'on compare les deux conditions en présence et en absence de CGS-15943, on remarque que le changement le plus important touche les profils de désensibilisation. En outre, le niveau de l'activation maximale est plus faible pour le récepteur D_{1A2} en absence de CGS-15943 qu'en présence de cet antagoniste. Ces éléments indiquent que l'activation des récepteurs A_1 dans les cellules COS-7 intervenient de façon permanente pour atténuer la réponse des récepteurs D_1 et plus particulièrement du sous-type D_{1A}.

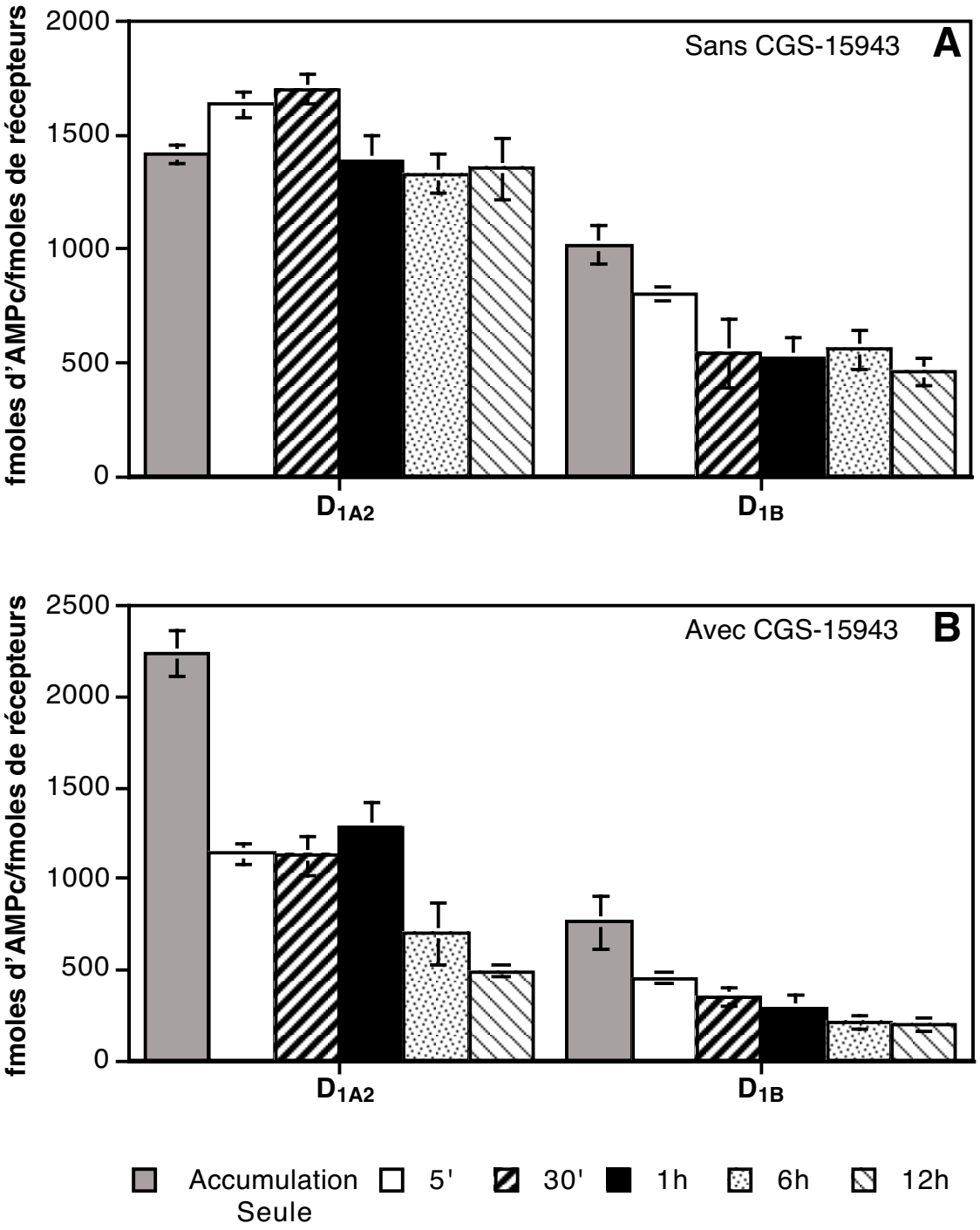


Figure 34 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en présence ou non de CGS-15943 dans le milieu.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour la Figure 27. Les récepteurs D_{1A2} et D_{1B} sont exprimés de façon transitoire dans les cellules COS-7, et l'on rajoute (**B**) ou non (**A**) du CGS-15943 (antagoniste des récepteurs A_1 de l'adénosine) dans le milieu. Chaque graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

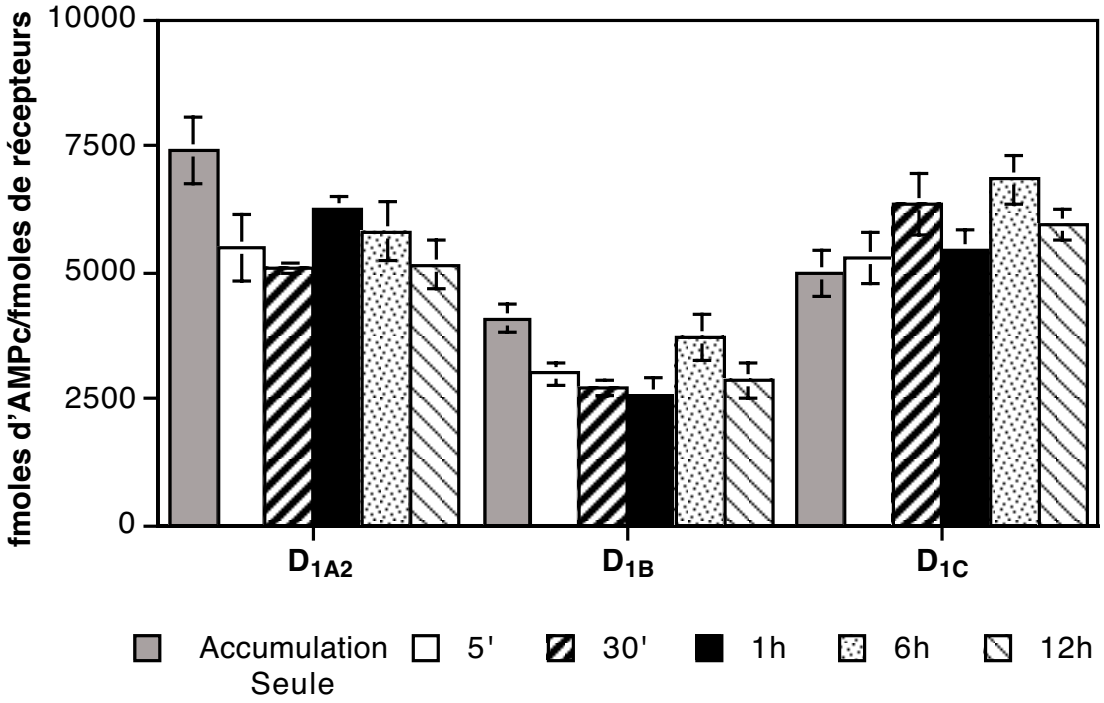


Figure 35 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en absence de sérum de veau fœtal dans le milieu.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour la Figure 34A. Les récepteurs D_1 sont exprimés de façon transitoire dans les cellules COS-7, le sérum étant absent de tous les milieux (prétraitement et stimulation). Chaque graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

Le sous-type D_{1B} est également affecté car son profil ainsi que son taux d'activation maximale sont modifiés en présence de CGS-15943 mais plus faiblement. Lorsque l'on supprime les hormones et les petites molécules du sérum contenu dans le milieu de culture afin d'éliminer tout composé pouvant activer les récepteurs A_1 (comme l'adénosine), les profils des récepteurs D_1 sont proches de ceux qui sont obtenus lorsque le CGS-15943 est absent du milieu de prétraitement (Figure 35). Il semble donc que l'activation des récepteurs A_1 ne soit pas due à un composé présent dans le milieu de culture.

Les récepteurs A_1 de l'adénosine n'étant pas connus pour être des récepteurs à activité constitutive, nous avons testé l'hypothèse que les cellules COS-7 sécrèteraient elles-mêmes le composé capable d'activer les récepteurs A_1. Nous avons ajouté au milieu de culture de l'adénosine déaminase (10 u/ml), qui dégrade l'adénosine produite par les cellules et qui s'accumule dans le milieu. En présence de cette enzyme, les profils de désensibilisation sont proches de ceux qui sont observés lorsque l'on rajoute le CGS-15943 dans le milieu de prétraitement (Figure 36). On observe bien pour le récepteur D_{1A2}, le profil de désensibilisation

en deux parties, avec une baisse totale d'accumulation de 60% après 12 heures de traitement à l'apomorphine. Le fait de ne pas atteindre les mêmes valeurs finales pourrait s'expliquer par un phénomène de dégradation ou de saturation de l'adénosine déaminase. Pour le récepteur D_{1B}, le profil obtenu est le même que celui observé en présence de l'antagoniste A_1.

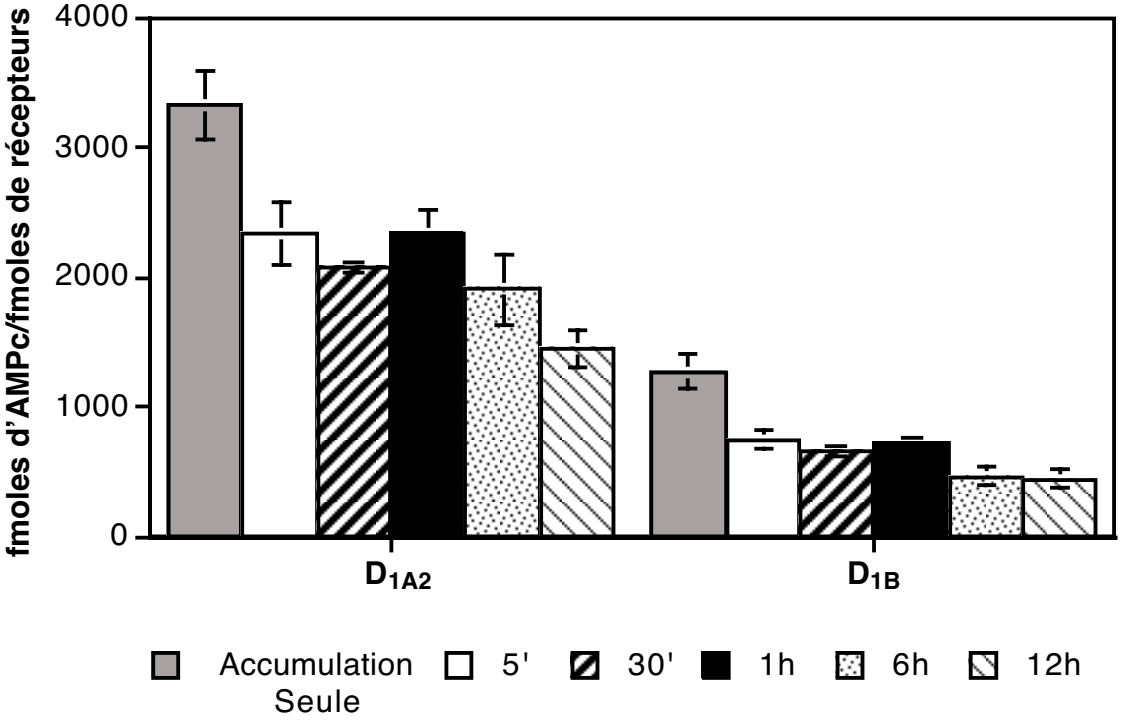


Figure 36 : Profils de désensibilisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7 en présence d'adénosine déaminase dans le milieu de prétraitement.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour la Figure 34A, avec dans le milieu de prétraitement de l'adénosine déaminase (10 u/ml). Les récepteurs D_{1A2} et D_{1B} sont exprimés de façon transitoire dans les cellules COS-7. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

II.B. Analyse des modulations des récepteurs D_{1A} par les récepteurs A_1 de l'adénosine

II.B.1. Rappels sur les modes d'interactions entre l'adénosine et la dopamine

Un grand nombre d'interactions impliquant notamment les récepteurs D_1 et D_2 semblent montrer que la dopamine joue un rôle principalement modulateur dans la communication neuronale, y compris en interaction avec d'autres systèmes de transmetteurs (pour revue voir Zoli *et al.*, 1993). Les interactions les plus étudiées concernent les relations entre les récepteurs de la

dopamine et de l'adénosine. Le nucléoside endogène adénosine fonctionne comme un neuromodulateur dans de nombreuses régions du système nerveux central des mammifères. En conditions basales, l'adénosine est présente dans le milieu extracellulaire entre 0,02 et 1 mM. Sa concentration augmente en cas d'hypoxie et d'activité nerveuse intense. La libération d'adénosine est diffuse et continue dans tout le neurone, en réponse à une augmentation du métabolisme. De plus, l'adénosine tend à réduire sa propre formation. Les actions de l'adénosine sont dues à deux types de récepteurs A_1 et A_2. Les récepteurs A_1 inhibent l'adénylate cyclase alors que les récepteurs A_2 l'activent.

Certains effets comportementaux, induits par des agonistes ou antagonistes de l'adénosine, suggèrent l'existence d'une interaction inhibitrice entre les récepteurs A_1 et D_1 (pour revue voir Ferré *et al.*, 1997; Fuxe *et al.*, 1998). L'étude du comportement *in vivo* a bien montré l'existence de ces interactions entre les récepteurs adénosine A_1 et dopamine D_1 dans le cerveau du rat ou du lapin. En effet, les agonistes A_1 diminuent l'activation motrice induite par les agonistes D_1 (Ferré *et al.*, 1994). Ces effets semblent provenir d'interactions en partie indépendantes des protéines G puisque l'injection d'un analogue du GTP non hydrolysable entraîne des effets qui s'additionnent à l'injection d'un agoniste A_1. L'administration systémique d'un agoniste (cyclopentyladénosine) de l'adénosine contrecarre une série de comportements produits par l'agoniste D_1 : SKF 38393. Ces résultats sont en faveur d'une interaction antagoniste entre les récepteurs A_1 et D_1 dans les ganglions de la base et le cortex cérébral (Ferré *et al.*, 1994). Les distributions anatomiques étudiées par hybridation *in situ* indiquent que les récepteurs A_1 et D_1 sont colocalisés dans des neurones du striatum de taille moyenne appartenant à la voie directe striatopédonculée (Ferré *et al.*, 1996). Les neurones de cette voie ont toutes les caractéristiques pour faire partie de la région majeure des interactions principales adénosine/dopamine dans le cerveau.

Dans des préparations de membranes de striatum de rat, les récepteurs A_1 sont capables de moduler les profils de liaison des récepteurs D_1 (Ferré *et al.*, 1998). Des effets identiques ont été reportés dans des fibroblastes de souris exprimant de façon stable les récepteurs A_1 et D_1 (Ferré *et al.*, 1997). Cela peut expliquer certains effets moteurs de l'adénosine. En conclusion, il semble clair que lorsque les deux récepteurs sont présents dans une cellule, les récepteurs A_1 réduisent la proportion de récepteurs D_1 dans l'état de haute affinité et disponibles pour la liaison du ligand. Cette interaction doit être due au découplage du récepteur D_1 de la protéine G, car un effet semblable est observé en utilisant un analogue du GTP non hydrolysable, le Gpp(NH)p. La construction d'une lignée de fibroblastes (Ltk-) exprimant de façon stable les récepteurs D_{1A} et A_1 humains dont les valeurs de Bmax sont très proches (4 pmoles /mg de protéines pour le récepteur A_1 et 4,6 pour le récepteur D_1), a permis de mettre en évidence certaines interactions entre ces récepteurs (Ferré *et al.*, 1998). Ainsi les agonistes A_1 induisent une diminution de l'accumulation

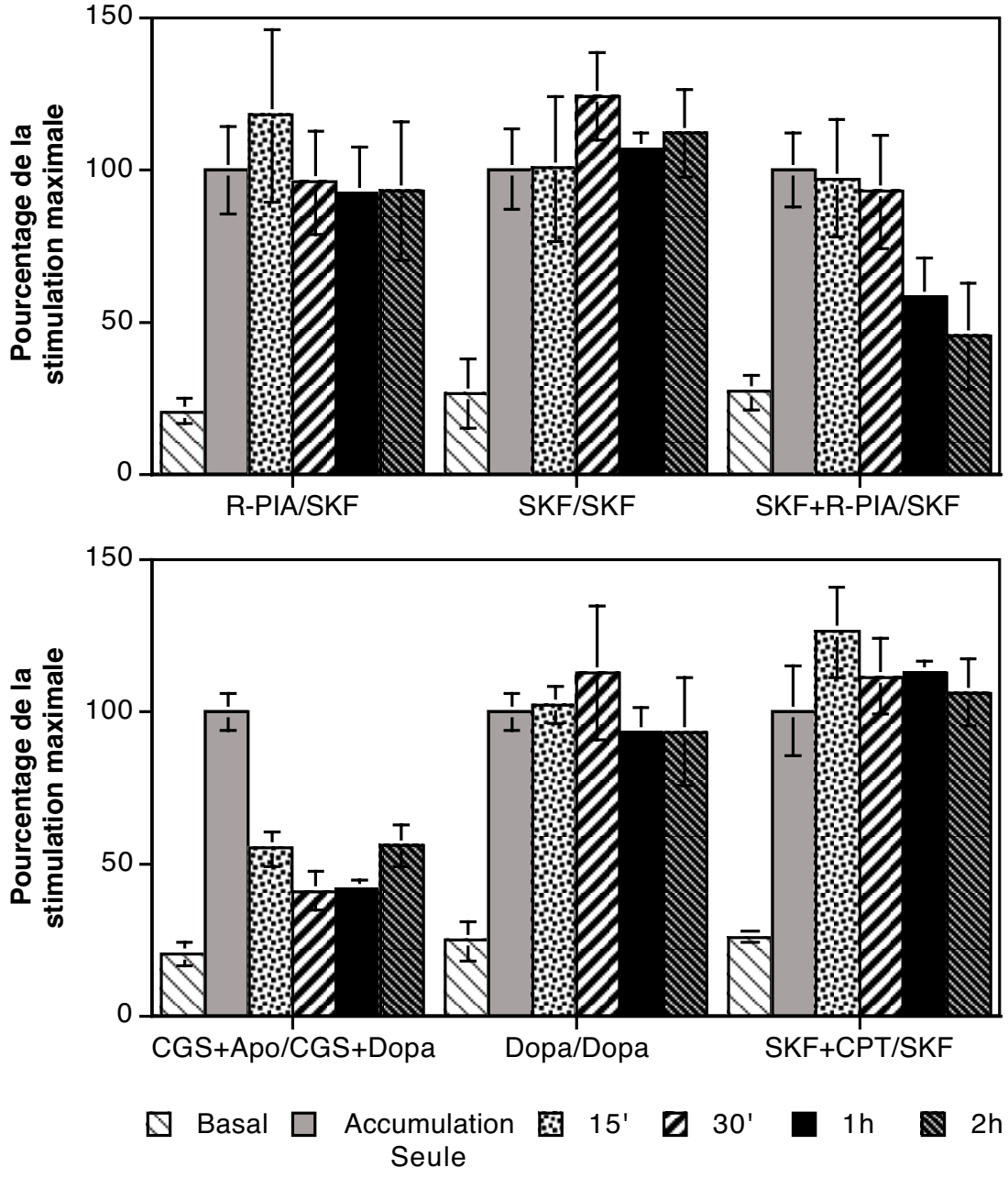


Figure 37 : Analyses des interactions entre les récepteurs A_1 de l'adénosine et D_{1A} de la dopamine exprimés de façon stable dans les cellules Ltk-.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour les cellules COS-7 (Figure 34). Les différents temps de prétraitement sont notés ci-dessus. Les composés utilisés sont indiqués en dessous de chaque condition avec en premier ceux qui sont employés lors du prétraitement et ensuite ceux qui le sont lors de la phase d'accumulation. Les concentrations utilisées sont de 10 μM pour le CGS-15943, le CPT, l'apomorphine, la dopamine et le SKF-38393 et de 100 nM pour le R(-)-PIA. Chaque graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

de l'AMPc après activation par la dopamine du récepteur D_1. De plus, le blocage de la voie de signalisation des récepteurs A_1, soit par un antagoniste, soit par la toxine pertussique (inhibitrice des protéines G_i), augmente le niveau d'AMPc basal qui est activé par les récepteurs D_1. Ces expériences suggèrent une activité tonique des récepteurs A_1.

II.B.2. Expériences sur la lignée stable (Ltk-) exprimant les récepteurs A_1 et D_{1A}

Afin d'analyser de façon plus contrôlée cette interaction entre les récepteurs A_1 et D_1, nous avons utilisé la lignée fibroblastique Ltk- exprimant de façon stable les récepteurs humains A_1 de l'adénosine et D_{1A} de la dopamine. Ces cellules nous ont été transmises dans le cadre d'une collaboration avec Sergi FERRÉ du laboratoire de Kjell FUXE (Ferré *et al*., 1998). Grâce à cette lignée, nous avons analysé les interactions fonctionnelles qui pouvaient exister entre ces deux types de récepteurs. De façon intéressante, nous n'avons pas pu observer de diminution de l'accumulation de l'AMPc quand un agoniste A_1 (R(-)-PIA à 100 nM) ou D_1 (SKF-38393 à 10 μM) se trouve seul dans le milieu de culture après deux heures d'activation (Figure 37). Si on observe bien une augmentation du niveau d'activation par rapport au niveau de base, de l'ordre de quatre fois, aucune diminution n'est constatée après 2 heures de prétraitement. Dans ces expériences, la stimulation a été effectuée avec le SKF-38393 pour s'assurer que l'activation est bien spécifique du récepteur D_{1A}. Cependant, le prétraitement avec de la dopamine et la stimulation après lavage avec cet agoniste naturel donnent les mêmes observations à savoir aucune diminution au bout de 2 heures de l'accumulation d'AMPc (Figure 37). Si comme nous l'avons vu, l'addition dans le milieu de prétraitement du CGS-15943 (10 μM) à l'apomorphine restaure une inhibition de l'accumulation d'AMPc avec un rebond après une heure, tous les résultats ne sont pas aussi clairs (Figure 37). En effet, lorsque l'on prétraite les cellules avec du SKF-38393 10 μM et le R(-)-PIA à 100 nM, on constate également une diminution de l'accumulation de l'AMPc mais beaucoup plus lente. Et lorsque à la place du R(-)-PIA, on utilise du 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) un autre agoniste spécifique des récepteurs A_1, on ne remarque à nouveau plus aucun changement dans l'accumulation de l'AMPc. Toutes ces observations contradictoires semblent indiquer que, s'il y a bien une modulation des récepteurs D_1 par les récepteurs A_1, cette interaction n'est peut-être pas directe et fait intervenir d'autres éléments de l'environnement cellulaire.

En conclusion, ces expériences mettent en valeur en premier lieu la complexité de l'utilisation des modèles d'étude. Mais surtout, elles indiquent que la cellule offre une réponse globale aux signaux qu'elle reçoit à travers de nombreusesinteractions entre les récepteurs qu'elle exprime et leurs voies de signalisation.

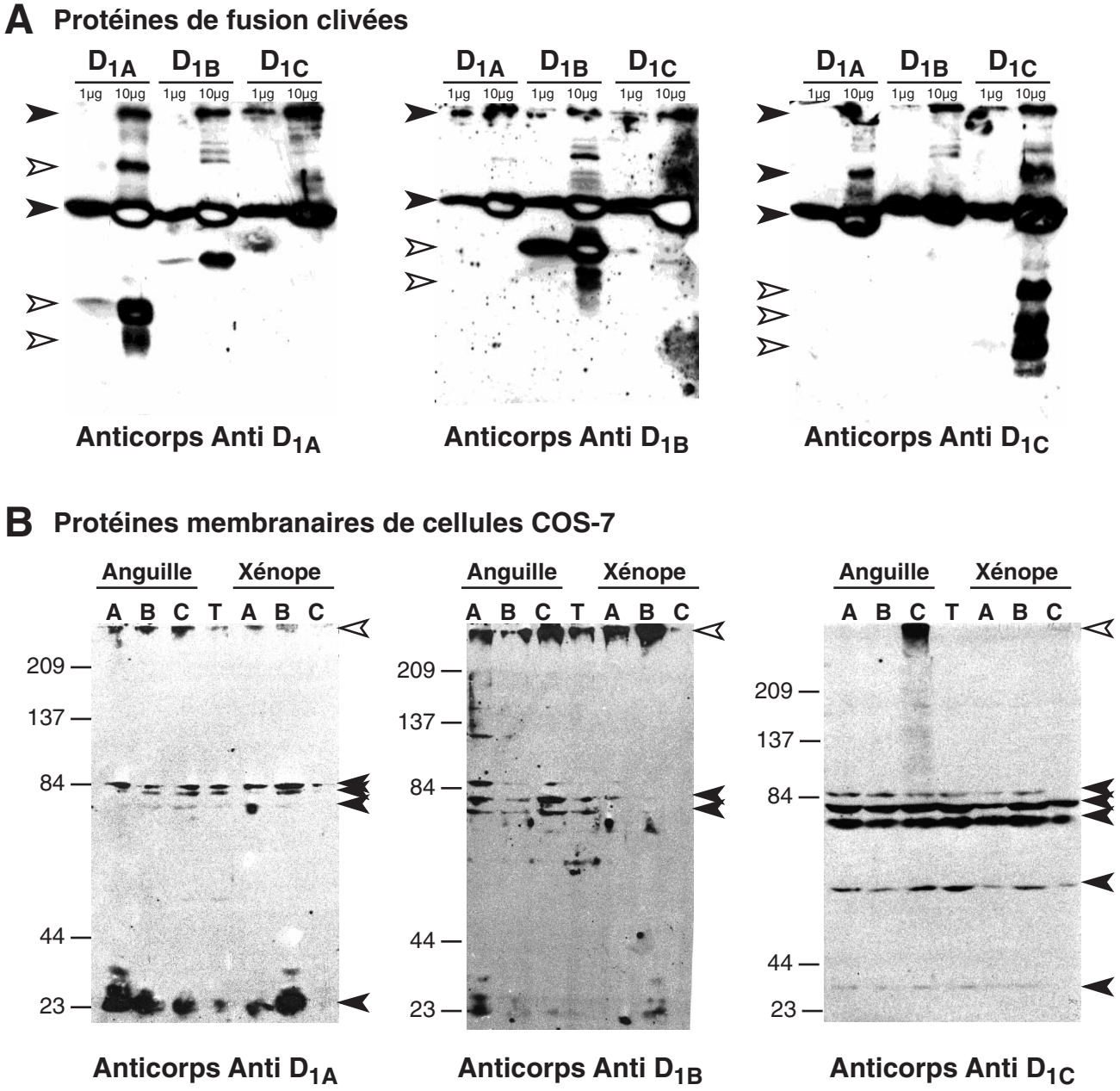


Figure 38 : Tests des anticorps polyclonaux dirigés contre les sous-types du récepteur D_1 de xénope.

A. Les protéines de fusion récepteur-GST purifiées et clivées par la thrombine sont déposées à raison de 1 ou 10 µg de protéines totales pour chaque sous-type du récepteur D_1. Les anticorps obtenus chez les lapins après le premier prélèvement sont utilisés au 1/500e. La réaction chemiluminescente est révélée 5 minutes après exposition. Les flèches creuses indiquent les bandes qui sont spécifiques des récepteurs, les flèches pleines celles qui sont obtenues par réactions croisées avec d'autres anticorps. **B.** Les protéines membranaires de cellules COS-7 sont récupérées après électroporation des sous-types du récepteur D_1 d'anguille ou de xénope D_{1A} (A), D_{1B} (B) et D_{1C} (C), et 75µg de protéines totales sont déposés sur un gel SDS-PAGE. On charge également sur le gel les protéines de cellules COS-7 non transfectées (T). Les anticorps à tester sont incubés au 1/1000e et la réaction chemiluminescente est révélée après 3 heures d'exposition. Les flèches creuses indiquent les régions où l'on retrouve un marquage spécifique du récepteur, les flèches pleines pointent vers les protéines non spécifiques marquées.

III. Obtention d'anticorps polyclonaux anti-récepteurs D_1

III.A. Caractérisation des anticorps

Dans un premier temps, nous avons voulu obtenir des anticorps dirigés contre chaque sous-type du récepteur D_1 afin de les utiliser pour les observations anatomiques et l'analyse cellulaire des récepteurs. De plus, afin d'obtenir des anticorps capables de reconnaître un spectre d'espèce assez large nous avons utilisé les régions C-terminales des récepteurs de xénope. Grâce à sa localisation phylogénétique assez centrale dans l'arbre des vertébrés, le choix d'obtenir des anticorps chez un amphibien devait augmenter nos chances de les utiliser aussi bien avec des récepteurs de poisson que de mammifères. De plus, les régions C-terminales présentent la plus grande diversité de séquences entre chacun des sous-types tout en étant conservées d'une espèce à l'autre, ce qui devait être un atout pour obtenir des anticorps très discriminants.

Les sérums prélevés sur des lapins immunisés, par des protéines de fusion entre la GST et les régions C-terminales de chaque sous-type du récepteur D_1, ont été d'abord testés par western blot contre les protéines obtenues après clivage du fragment de récepteur et de la protéine GST fusionnée (Figure 38A). On observe bien un marquage spécifique pour chaque anticorps envers sa protéine (flèches creuses), mais on note un certain nombre protéines marquées de manière non spécifique (flèches pleines). Sur des extraits cellulaires obtenus à partir de transfections dans les lignées COS-7, chacun des anticorps reconnaît le récepteur contre lequel il est dirigé (Figure 38B). Cependant, il existe des bandes surnuméraires reconnues dans les extraits cellulaires pour tous les anticorps (flèches pleines). Si chaque anticorps reconnaît bien les récepteurs, la spécificité n'est pas très importante pour les récepteurs D_{1A} et D_{1B}. Enfin, l'anticorps dirigé contre le récepteur D_{1C} ne semble pas reconnaître le récepteur de xénope, mais uniquement celui de l'anguille.

III.B. Étude morphologique de la désensibilisation des récepteurs D_{1B}

En immunocytochimie, toujours sur les cellules COS-7 transfectées avec les différents sous-types du récepteur D_1, seul l'anti-D_{1B} non purifié donne un marquage satisfaisant. C'est l'anticorps que nous avons utilisé pour suivre les récepteurs dans les cellules COS-7 après traitement à la dopamine (10 μM) de 5 minutes à 2 heures (Figure 39).

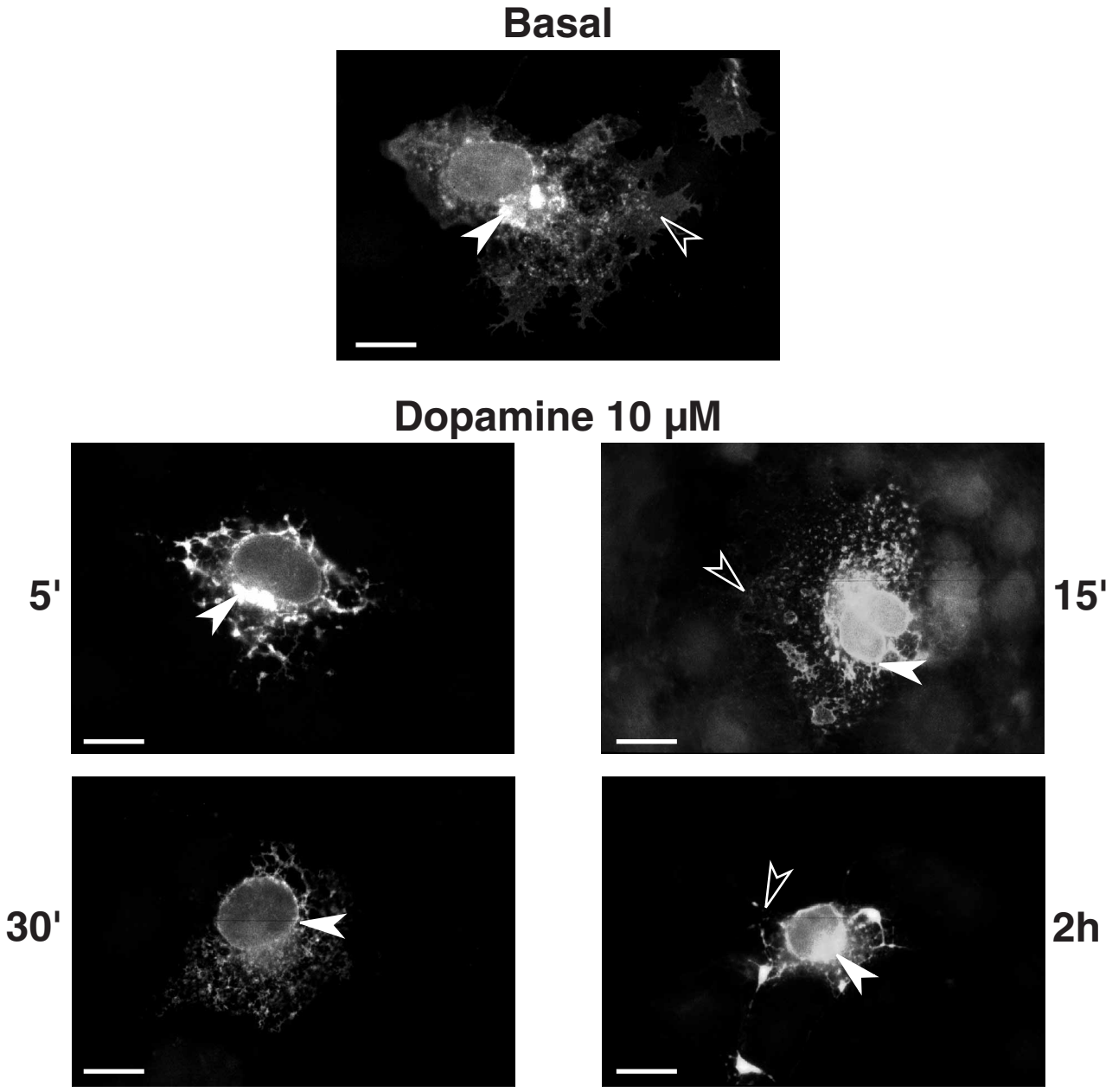


Figure 39 : Observations morphologiques de la désensibilisation du récepteur D_{1B} à l'aide d'un anticorps polyclonal dans les cellules COS-7.

La distribution des récepteurs D_{1B} a été observée par microscopie à fluorescence après électroporation dans les cellules COS-7. Le récepteur est présent à la membrane plasmique (flèche creuse). A cause du niveau d'expression élevé, la voie de sécrétion (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) est fortement marquée (flèche pleine). Les cellules sont traitées selon les temps indiqués avec de la dopamine (10 µM). L'anticorps polyclonal utilisé (1/1000e) est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine. La barre correspond à 10 µm.

Dans les cellules transfectées non traitées (basal), on remarque un marquage de tout l'appareil de sécrétion (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi, flèche pleine) mais surtout un voile sur toute la cellule correspondant au marquage membranaire (flèche creuse). Après 5 minutes d'exposition à la dopamine, le marquage membranaire semble diminuer pour devenir principalement intracellulaire, formant un réseau proche de l'aspect du réticulum endoplasmique (flèche pleine). Toutefois l'observation en microscopie à fluorescence à tendance à masquer le marquage membranaire assez fin (flèche creuse à 15 minutes), par rapport à celui des voies de sécrétion, très important. Il n'est pas possible d'observer des regroupements de récepteurs à la membrane plasmique comme cela a été décrit pour d'autres types de récepteurs. A 30 minutes d'exposition, on observe une diminution du marquage en réseau qui semble devenir plus flou (flèche pleine). Ce phénomène pourrait correspondre à une concentration des récepteurs dans des vésicules. Enfin, après 2 heures de traitement, le marquage se concentre dans des structures vésiculaires plus larges et irrégulières. Cependant, il reste toujours du marquage à la membrane plasmique (flèche creuse).

La fabrication de ces anticorps ne nous a pas permis d'obtenir des résultats clairs. Seul l'anti-D_{1B} semble donner un marquage précis et spécifique en immunocytochimie puisque l'on ne l'observe pas sur des cellules COS-7 exprimant les récepteurs D_{1A2} ou D_{1C} d'anguille. Pour l'anticorps anti-D_{1A2}, aucun marquage n'a été observé et, pour l'anticorps anti-D_{1C}, le bruit de fond observé est trop important. A contrario, lors des expériences de western blots, c'est l'anticorps anti-D_{1C} qui semble montrer la meilleure spécificité par rapport aux deux autres. Nous avons donc cherché à développer un autre moyen d'étude pour l'analyse cytologique des sous-types de récepteurs de la dopamine. C'est pour cette raison, que nous avons développé des protéines de fusion entre chaque sous-type et la protéine fluorescente GFP.

IV. Caractérisation des constructions D_1-GFP

Pour suivre de façon dynamique les mouvements des récepteurs dans les cellules, nous avons choisi d'utiliser la protéine GFP afin d'obtenir une fluorescence intense nécessaire à l'utilisation du microscope confocal. L'absence d'agoniste fluorescent pour les récepteurs de la dopamine nous a encouragé à une utiliser cette protéine. La GFP est une protéine de 238 acides aminés qui absorbe la lumière bleue autour de 395 nm et émet à 509 nm une lumière verte (Chalfie *et al.*, 1994). Cette fluorescence très stable et peu sensible au photoblanchiment est observée dès les 3 premières heures d'expression et jusqu'à 4 jours en transfection transitoire (Peters *et al.*, 1995). Comme les récepteurs de la dopamine sont transmembranaires, et pour

éviter le problème inhérent au passage de la membrane lors de la traduction, nous avons choisi de la fusionner à l'extrémité C-terminale des récepteurs qui reste cytoplasmique. De plus, afin de pouvoir vérifier par un moyen autre que la GFP, la localisation du récepteur, nous avons décidé d'étiqueter à l'extrémité N-terminale les constructions avec un épitope de la protéine VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus - Glycoprotein) reconnu par l'anticorps monoclonal P5D4. Celui-ci peut facilement passer la membrane lors de la traduction et être reconnue par l'anticorps du côté extracellulaire de la membrane plasmique, à condition que la glycosylation ne la masque pas. Cet épitope doit permettre, si l'immunocytochimie est effectuée sans perméabilisation, d'observer la fraction exclusivement membranaire des récepteurs.

Afin de pouvoir disposer des clones des récepteurs D_1 fluorescents de façon simple, nous avons opté pour la mutation du codon d'initiation de la traduction de la protéine GFP sur le plasmide d'origine pEGFP-N1. Cette modification est obtenue avec un oligonucléotide introduisant la substitution de la méthionine en valine et supprimant le site consensus de Kozak de reconnaissance des ribosomes, tout en conservant la phase originelle de la protéine dans le plasmide pEGFP-N1. Cette mutation avait deux buts. Le premier était d'éviter les réinitiations de la protéine GFP seule, étant donné que le site de clonage en amont de l'initiation contient de nombreuses séquences palindromiques. Le second était d'améliorer et de faciliter la méthode de construction des chimères. Puisque le codon d'initiation de chaque sous-type du récepteur D_1 avait aussi été muté, l'unique ATG disponible pour l'initiation de la traduction est celui de l'étiquette VSV-G ajoutée à l'extrémité N-terminale du récepteur (Figure 22). Dans ces conditions, les seuls clones fluorescents sont en théorie ceux dont la fusion s'est déroulée de façon correcte rétablissant le cadre de lecture depuis l'étiquette VSV-G jusqu'au codon stop de la GFP. Le criblage des clones positifs est alors facilité. La séquence de chacun des clones positifs choisi est finalement vérifiée par séquençage afin de s'assurer que les séquences ont été amplifiées sans erreurs.

Même si dans l'ensemble, les fusions des récepteurs couplés aux protéines G à la GFP ne semblent pas modifier le comportement des récepteurs (Abe *et al.*, 2000; Awaji *et al.*, 1998; Barak *et al.*, 1997b; Drmota *et al.*, 1998; Slice *et al.*, 1998; Tarasova *et al.*, 1997), nous voulions être sûrs que, dans notre analyse, cette modification n'entraînait pas de changement global des caractéristiques des récepteurs ni des propriétés que nous voulions étudier. En effet, la détermination de critères d'homologie pour chaque récepteur implique que la modification en C-terminal ne change pas les propriétés du récepteur. Nous avons donc, dans un premier temps, vérifié que l'addition de la protéine GFP ne changeait pas les conditions de liaisons des agonistes et antagonistes classiques des récepteurs de type D_1. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la structure reflète les contraintes évolutives qui s'appliquent aux récepteurs. C'est ainsi que les régions transmembranaires sont très conservées. De plus, les mutations qui affectent les

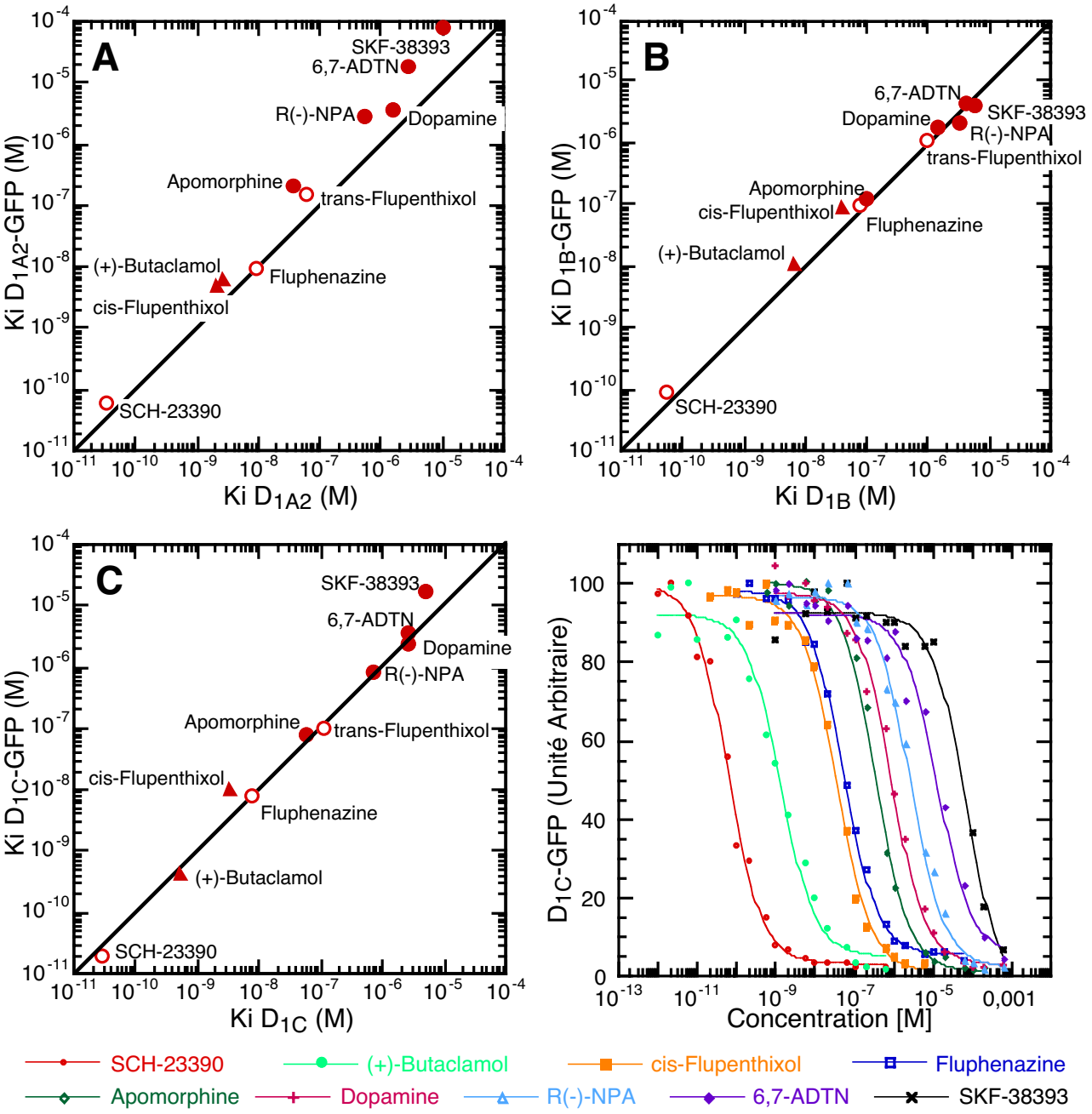


Figure 40 : Graphique de corrélation des valeurs de Ki obtenues pour chaque sous-type du récepteur D_1 et sa protéine de fusion GFP correspondante.

Les valeurs de Ki sont obtenues par déplacement de la liaison du ^{3}H-SCH-23390 en présence d'agoniste (cercle plein), d'antagonistes (cercle creux) ou d'agonistes inverses (triangle). Les Ki estimés sont donnés pour chaque sous-type D_{1A2} (A), D_{1B} (B) et D_{1C} (C). La ligne correspond à l'équimolarité. D. Diagramme détaillé des différentes courbes de déplacement obtenues pour le récepteur D_{1C}-GFP.

fonctions des récepteurs ont souvent une incidence plus ou moins importante sur les caractéristiques de liaison. Si les constantes de liaison sont conservées on peut donc affirmer que la structure du récepteur n'est pas modifiée.

IV.A. Vérification des profils pharmacologiques

Nous avons utilisé plusieurs agonistes, antagonistes et agonistes inverses pour déplacer par compétition la liaison du SCH-23390 radiomarquée au tritium. Les constantes d'inhibitions (Ki) sont représentées pour chaque paire de récepteur D_1 et de récepteur D_1 fusionné à la GFP (Figure 40). Les mesures sont obtenues selon le protocole décrit dans les “Méthodes” après transfection des récepteurs dans les cellules COS-7 par électroporation. La ligne d'identité montre pour chaque récepteur la corrélation qui existe pour les valeurs de Ki entre le récepteur sauvage et la chimère GFP. Dans chaque expérience, le niveau d'expression des récepteurs a été estimé à l'aide des valeurs de Bmax obtenues après liaison à l'équilibre (Figure 40). On observe que, lorsque le niveau d'expression des récepteurs s'élève de façon significative au-dessus de valeurs physiologiques, les valeurs de coefficients de dissociation (Kd) ont tendance à augmenter de façon artificielle. Des observations similaires ont été trouvées pour la liaison de composés tritiés sur des membranes de striatum ou sur des plaquettes sanguines (Arora *et al*., 1985; Leysen et Gommeren, 1981). Pour éviter d'être dans une gamme de valeur de Bmax qui n'est visiblement pas du tout physiologique, nous nous sommes servi uniquement les conditions dans lesquelles l'expression des récepteurs donne des valeurs de Kd proches pour les paires : récepteurs/chimères GFP, c'est-à-dire autour de 40 pM pour le récepteur D_{1A2} et D_{1A2}-GFP, 60 pM pour le D_{1B} et D_{1B}-GFP et 30 pM pour le D_{1C} et D_{1C}-GFP. Dans ces conditions, les valeurs de Bmax sont autour de 0,5 pmoles/mg de protéines pour le D_{1A2}, 2 pmoles pour le D_{1A2}-GFP, 0,5 pmoles pour le D_{1B}, 1 pmoles pour le D_{1B}-GFP, 0,5 pmoles pour le D_{1C} et 0,7 pmoles pour le D_{1C}-GFP (Figure 41).

Dans toutes les expériences de transfections transitoires, le taux d'expression des récepteurs fusionnés à la GFP est toujours supérieur à celui des récepteurs sauvages. Le fait que ces deux types d'ADNc soient contenus dans des vecteurs différents est sûrement la raison de cette différence. Pourtant, le vecteur pcDNA3 dans lequel ont été clonés les récepteurs D_1 sauvage et le vecteur pEGFP-N1 dans lequel sont insérées les fusions avec la GFP, possèdent tous les deux le même promoteur CMV (Cytomégalo Virus). Mais surtout la protéine GFP est connue pour sa demi-vie importante et a tendance à stabiliser les protéines qui y sont fusionnées (Li *et al*., 1998). Ces différences d'expression sont en fait surtout importantes pour les récepteurs D_{1A2} et D_{1A2}-GFP. On le remarque en regardant la ligne de corrélation des valeurs de Ki qui se retrouve déplacée vers l'axe de la construction D_{1A2}-GFP, alors que ce phénomène n'est pas

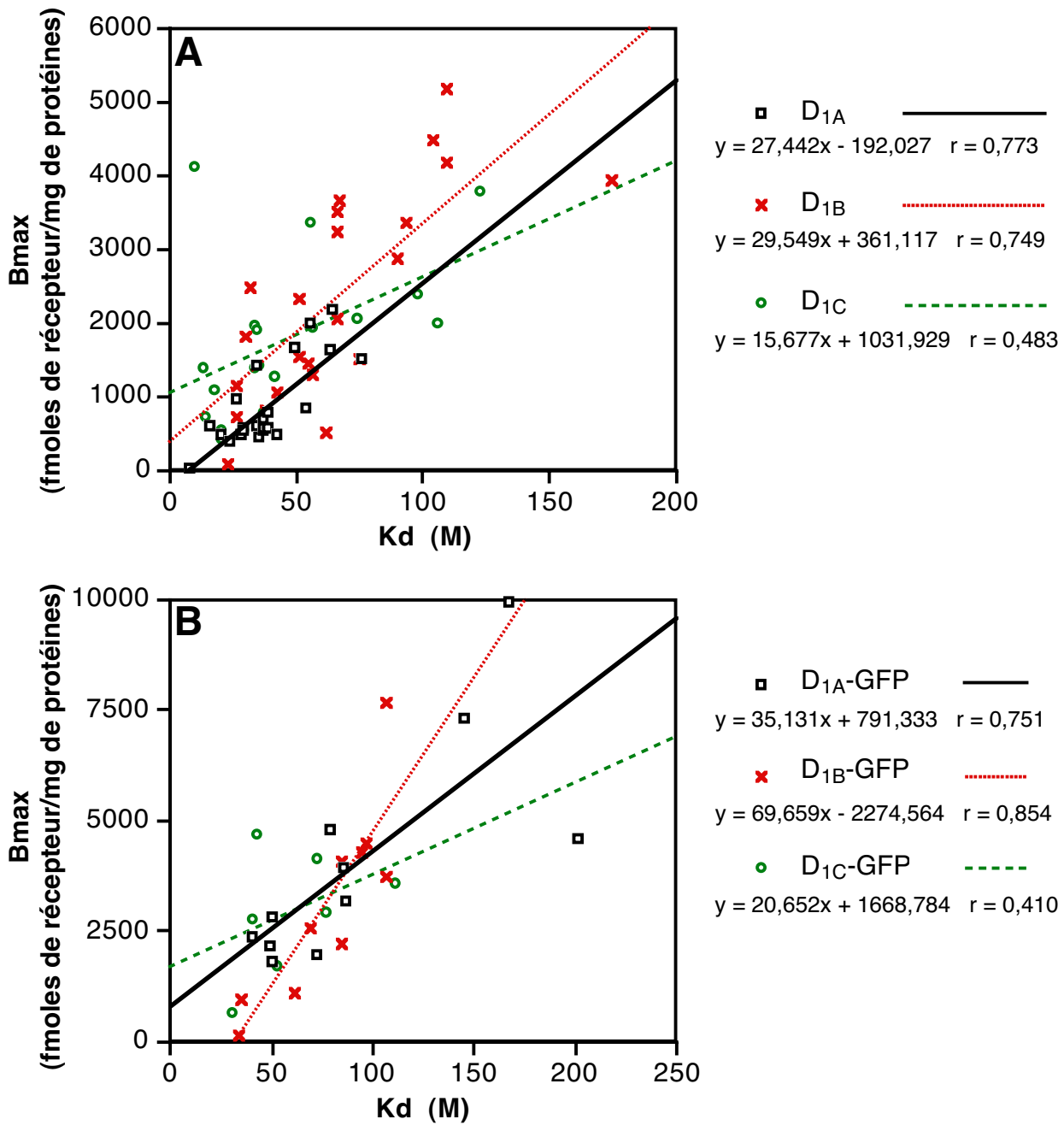


Figure 41 : Comparaison des valeurs de Kd (M) en fonction du taux d'expression du récepteur mesuré par le Bmax.

Sur ce schéma sont récapitulés tous les couples Bmax/Kd obtenus lors des transfections transitoires des récepteurs dans les cellules COS-7. Ces données regroupent aussi bien les analyses d'activité des récepteurs que les dosages de la quantité d'AMPc. Les droites de corrélations ont été calculées pour chaque sous-type du récepteur D_1 (**A**) et D_1-GFP (**B**) et les équations obtenues sont indiquées à côté des graphiques correspondants avec leur coefficient de corrélation.

observé pour les récepteurs D_{1B} ou D_{1C}. Néanmoins, les valeurs de Ki pour chaque composé restent apparemment très bien alignées, ce qui démontre que l'ajout de la protéine GFP à l'extrémité C-terminale des récepteurs D_1 ne semble pas modifier les propriétés de liaison des récepteurs. De plus, l'ordre des valeurs d'affinité de liaison des composés n'est pas différent de celui obtenu dans des expériences antérieures (Cardinaud *et al.*, 1997) puisque l'on retrouve pour chaque récepteur le profil attendu SCH-23390 > (+)-butaclamol, *cis*-flupenthixol > apomorphine > dopamine, R(-)-NPA, 6,7-ADTN. Par conséquent, la structure globale de ces protéines nécessaire à la liaison des ligands n'est pas modifiée de façon significative.

IV.B. Analyse des profils fonctionnels des fusions D_1-GFP

Afin de vérifier que la capacité d'activer l'adénylate cyclase a été conservée pour chaque chimère récepteur/GFP, nous avons effectué un dosage de l'accumulation d'AMPc après transfection transitoire par électroporation des récepteurs dans les cellules COS-7. Les valeurs de dosage d'AMPc sont normalisées par la quantité de protéine présente au fond de chaque puits pour tenir compte du nombre de cellules. Ensuite, la valeur ainsi obtenue est divisée par les mesures de Bmax calculées pour chaque dosage de manière à quantifier l'expression de chaque construction dans la cellule (Figure 42). Dans tous les cas, les profils obtenus sont tout a fait habituel pour les récepteurs D_1. Les récepteurs sauvages et les fusions avec la protéine GFP répondent à l'activation par la dopamine et par l'agoniste spécifique SKF-38393, et ces effets sont bloqués par l'antagoniste spécifique SCH-23390. Comme nous l'avons vu pour les profils pharmacologiques précédents, le récepteur D_{1A2}-GFP possède un taux d'expression plus élevé que le récepteur D_{1A2}. C'est pour cette raison que les valeurs d'activation obtenues sont plus faibles que celle du récepteur D_{1A2}. En effet, les valeurs étant divisées par le Bmax, les données apparentes d'activation semblent plus basses, bien que les valeurs absolues soient plus fortes pour la construction D_{1A2}-GFP.

En gardant à l'esprit cette limitation, le profil obtenu pour les récepteurs non modifiés et les constructions GFP sont très proches. On observe les mêmes niveaux de base et d'activation par la dopamine pour chaque paire de récepteurs. L'accumulation d'AMPc est en général de cinq à dix fois plus forte après traitement par la dopamine, les efficacités des récepteurs sauvages et fusionnés à la GFP restent similaires. Le SKF-38393 est connu pour être un agoniste partiel des récepteurs D_1 de la dopamine, mais dans nos expériences, cet effet n'est pas ou très peu observé (D_{1B} et D_{1A2}-GFP, Figure 42A et B), ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de ce composé à une concentration (10 μM) plus forte que celle utilisée physiologiquement et par le taux élevé d'expression des récepteurs D_1. Enfin, quoi que statistiquement non-significative dans cette

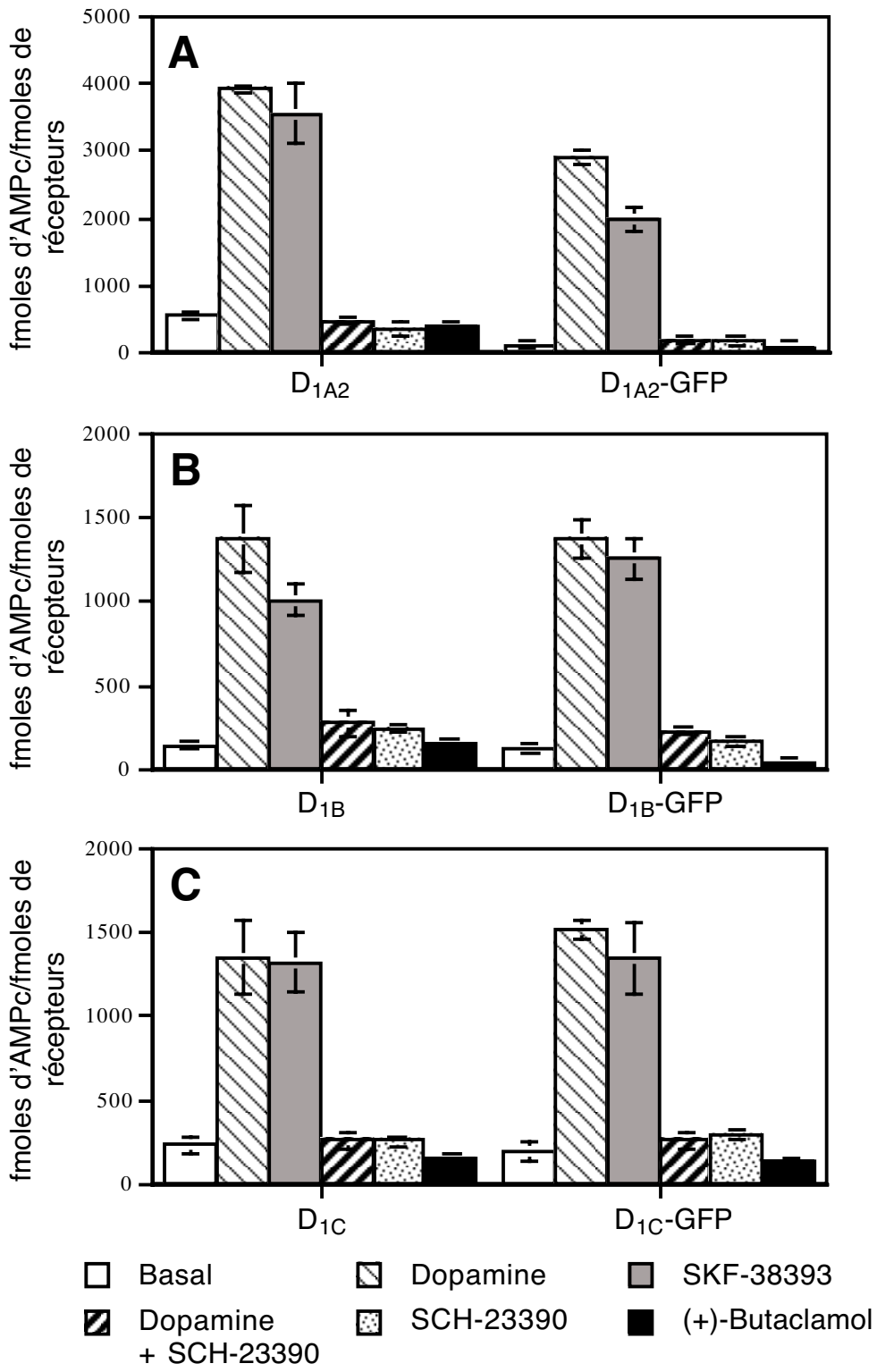


Figure 42 : Comparaison de l'activité des récepteurs D_1 et des fusions avec la protéine GFP dans les cellules COS-7 par dosage de l'AMPc.

Les récepteurs exprimés dans les cellules COS-7 sont incubés avec différents composés (voir ci-dessus) à une concentration finale de 10 μM et en présence de propranolol 10 μM et d'IBMX 0,5 mM. La quantité d'AMPc dans chaque puits est divisée par la quantité de protéines et le nombre de récepteurs (Bmax). Ces résultats représentent quatre différentes expériences, chacune faite en double exemplaire. Les barres d'erreurs indiquent les valeurs d'écart-type.

expérience, la propriété d'agoniste inverse du (+)-butaclamol qui avait été décrite précédemment (Cardinaud *et al*., 1997) est observée pour les récepteurs D_{1B} et D_{1C} (Figure 42B et C).

L'utilisation de cellules de singe COS-7 pour l'étude des récepteurs de poissons peut sembler un problème d'un point de vue de la conservation des voies de signalisations, particulièrement si l'on cherche à analyser les variations au cours de l'évolution des espèces d'un paramètre fonctionnel. En fait, l'analyse phylogénétique des protéines G par exemple, montre qu'elles sont très conservées (Wilkie et Yokoyama, 1994; Yokoyama et Starmer, 1992). Le taux d'évolution des protéines G est très faible, proche de celui des histones. Ce sont des molécules très contraintes ayant subi très peu de divergence au cours du temps. Dans ces conditions, il est très vraisemblable que l'on analyse uniquement des paramètres fonctionnels des récepteurs et non ceux des voies de transduction de la cellule dans laquelle on les exprime.

Les trois sous-types du récepteur D_1 fusionnés à la protéine GFP ont été utilisés pour étudier leur localisation après exposition à l'apomorphine, dans les mêmes conditions que celles qui ont été utilisées pour les dosages biochimiques. Avant de pouvoir effectuer ces expériences, il était nécessaire de vérifier que les fusions entre les récepteurs et la protéine GFP se comportaient bien comme les récepteurs sauvages. Si comme nous l'avons déjà vu, les caractéristiques pharmacologiques et fonctionnelles “classiques” ne semblent pas être modifiées dans ces chimères, il fallait vérifier que les propriétés de désensibilisation ne l'étaient pas non plus. En effet, même si nous avons rajouté 5 acides aminés charnière entre la séquence du récepteur et celle de la GFP, la région C-terminale reste importante pour la désensibilisation. La présence d'une protéine de taille élevée (27 kDa), avec un encombrement plutôt important du fait de sa structure en tonneau (Figure 21), risquait de modifier les interactions protéiques dans cette région. L'observation des profils d'accumulation d'AMPc en réponse au traitement à l'apomorphine (Figure 43) indique que la fusion de la protéine GFP ne modifie pas les propriétés de désensibilisation observées pour chacun des sous-types. On retrouve les grandes caractéristiques déjà décrites, c'est-à-dire une baisse importante en deux temps de l'accumulation de l'AMPc par le récepteur D_{1A2}-GFP, avec un rebond jusqu'à une heure de traitement. On observe pour le récepteur D_{1B}-GFP des niveaux d'accumulation plus faibles que pour le D_{1A2}-GFP avec un profil général assez proche. Et pour le récepteur D_{1C}-GFP l'accumulation d'AMPc ne baisse pas au cours du temps d'exposition à l'apomorphine. Dans ces conditions, l'observation de la localisation subcellulaire des récepteurs lors du traitement à l'apomorphine peut-être étudiée grâce à ces constructions.

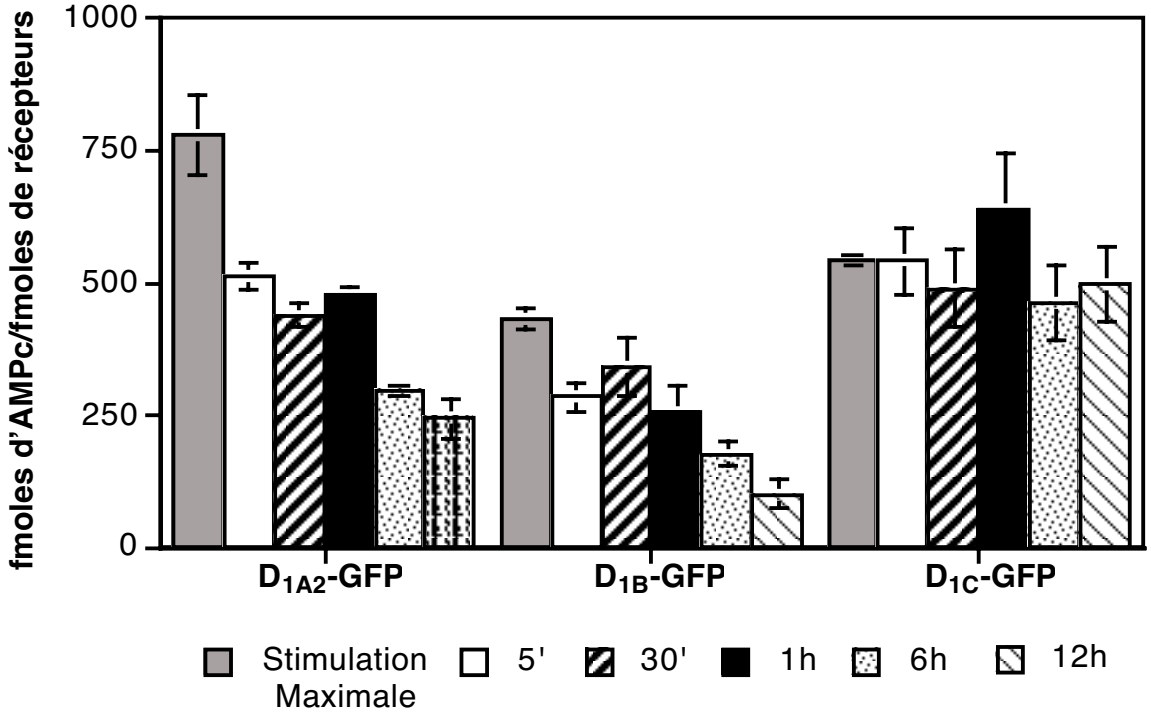


Figure 43 : Profils de désensibilisation des récepteurs fusionnés à la protéine GFP dans les cellules COS-7.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour la Figure 27. Les protéines de fusion sont exprimées de façon transitoire dans les cellules COS-7. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

IV.C. Observations cellulaires de la localisation des constructions

Comme nous l'avons constaté, un fort taux d'expression des récepteurs est obtenu pour les constructions GFP dans ces conditions transitoires d'expression. Quelles que soient les valeurs de Bmax après liaison de ligand, on observe un marquage intense de la voie de sécrétion, depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi (Figure 44, flèches pleines). Cependant, on aperçoit toujours un voile diffus de marquage sur toute la surface de la cellule, caractéristique d'une localisation à la membrane plasmique (flèches creuses). De plus, une augmentation de la fluorescence est observée aux endroits où la membrane se replie ou dans les régions d'adhérence de la membrane plasmique. Toutes ces observations montrent d'une part que les constructions GFP sont bien pleinement fonctionnelles et que la fluorescence de la GFP n'est pas masquée après la fusion. D'autre part, il semble qu'il n'y ait pas de marquage cytoplasmique indiquant la présence d'une traduction de la protéine GFP seule. Le marquage de la GFP dans le cytoplasme étant très différent de celui des récepteurs à la membrane (Figure 45). Enfin, on retrouve bien un

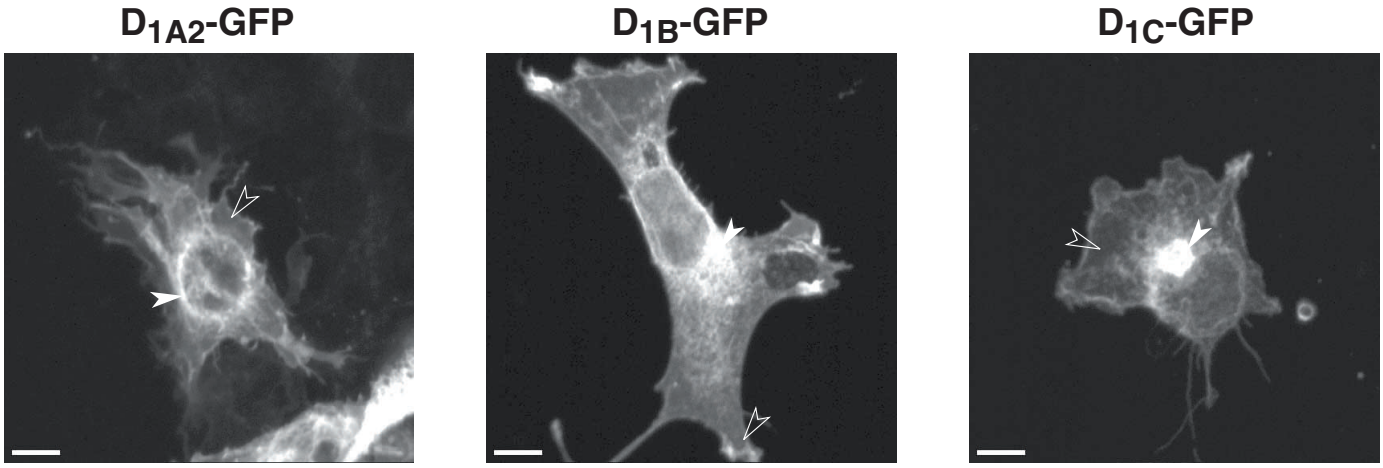


Figure 44 : Distribution des protéines de fusion récepteurs D_1/GFP dans les cellules COS-7.

La distribution des récepteurs D_1-GFP a été observée par microscopie confocale après électroporation des constructions dans les cellules COS-7. Les trois sous-types D_{1A2}, D_{1B} et D_{1C} sont présents à la membrane plasmique (flèche creuse). A cause du niveau d'expression élevé, la voie de sécrétion (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) est fortement marquée (flèche pleine). La barre correspond à 10 µm.

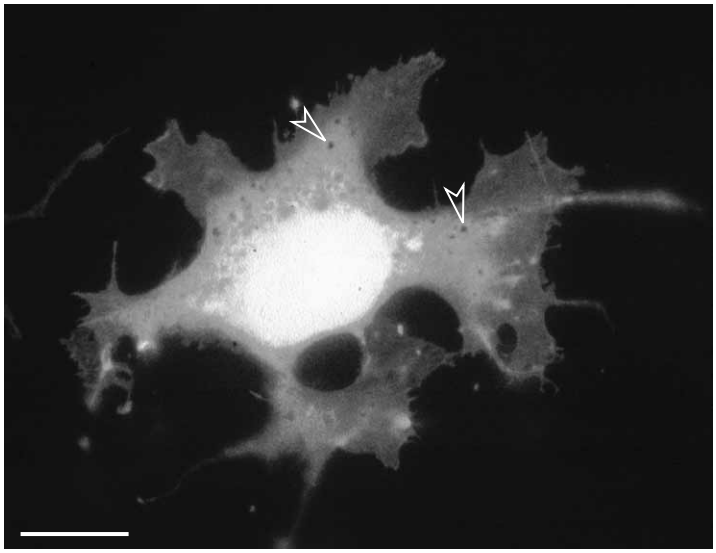


Figure 45 : Localisation de la protéine GFP seule dans les cellules COS-7.

La distribution de la protéine GFP a été observée par microscopie à fluorescence après électroporation du plasmide pEGFP-N1 non muté dans les cellules COS-7. Le marquage de la GFP est très important dans le noyau et dans le cytoplasme, et il exclue toutes les vésicules et organelles (flèche). La barre correspond à 10 µm.

marquage clair à la membrane de chacun des sous-types du récepteur D_1 comme on l'espérait d'un récepteur membranaire. En revanche, dans ce type cellulaire fibroblastique, on ne remarque aucune différence apparente de localisation subcellulaire entre les différents sous-types du récepteur D_1.

En conclusion, toutes ces observations montrent l'intégrité fonctionnelle de la fusion de la GFP aux récepteurs de la dopamine. En effet, l'ajout de cette protéine de taille importante (27 kDa) ne modifie visiblement ni les caractéristiques de couplage à l'adénylate cyclase (Figure 42), ni les capacités de liaison des ligands (Figure 40). Ces deux critères sont pourtant sensibles à de petits changements de structure puisqu'ils sont modifiées dans la quasi-totalité des mutations ponctuelles des récepteurs D_1 de la dopamine. Enfin, la localisation observée pour ces protéines de fusion est effectivement la membrane plasmique, comme attendu pour un récepteur membranaire.

V. Analyse de la localisation cellulaire des récepteurs D_1

V.A. Distribution cellulaire des fusions récepteurs D_1-GFP après exposition à un agoniste dopaminergique

V.A.1. Visualisation de la localisation des récepteurs D_1 dans les cellules COS-7

D'une manière générale, le traitement à l'apomorphine, agoniste dopaminergique de référence, ne modifie pas de façon importante la distribution de chaque sous-type du récepteur D_1 dans les nombreuses cellules COS-7 que nous avons observées en microscopie confocale (Figure 46). En regardant de façon plus précise la localisation détaillée des récepteurs D_1-GFP, quelques observations intéressantes ont été faites. Après 5 minutes de traitement à l'apomorphine, on remarque un net renforcement du marquage à la membrane plasmique pour les récepteurs D_{1A2}-GFP et D_{1B}-GFP (Figure 46, flèche creuse). Cette densification membranaire disparaît après 30 minutes d'exposition à l'agoniste et ne s'observe plus par la suite. Plus tard, après 6 heures de traitement, le marquage de la membrane plasmique est réduit pour la fusion D_{1A2}-GFP alors que cet effet est plus faible pour la construction faisant intervenir le récepteur D_{1B}. Douze heures après le début du traitement, les récepteurs D_{1A2}-GFP s'observent moins à la membrane (Figure 46, flèche pleine), bien que du marquage soit toujours présent dans le cas du récepteur D_{1B}-GFP. Il faut aussi noter que l'analyse précise des changements intracellulaires dans la localisation des fusions D_1-GFP est difficile à cause du marquage important de la voie de sécrétion. Finalement, aucune modification significative n'est observée pour le récepteur

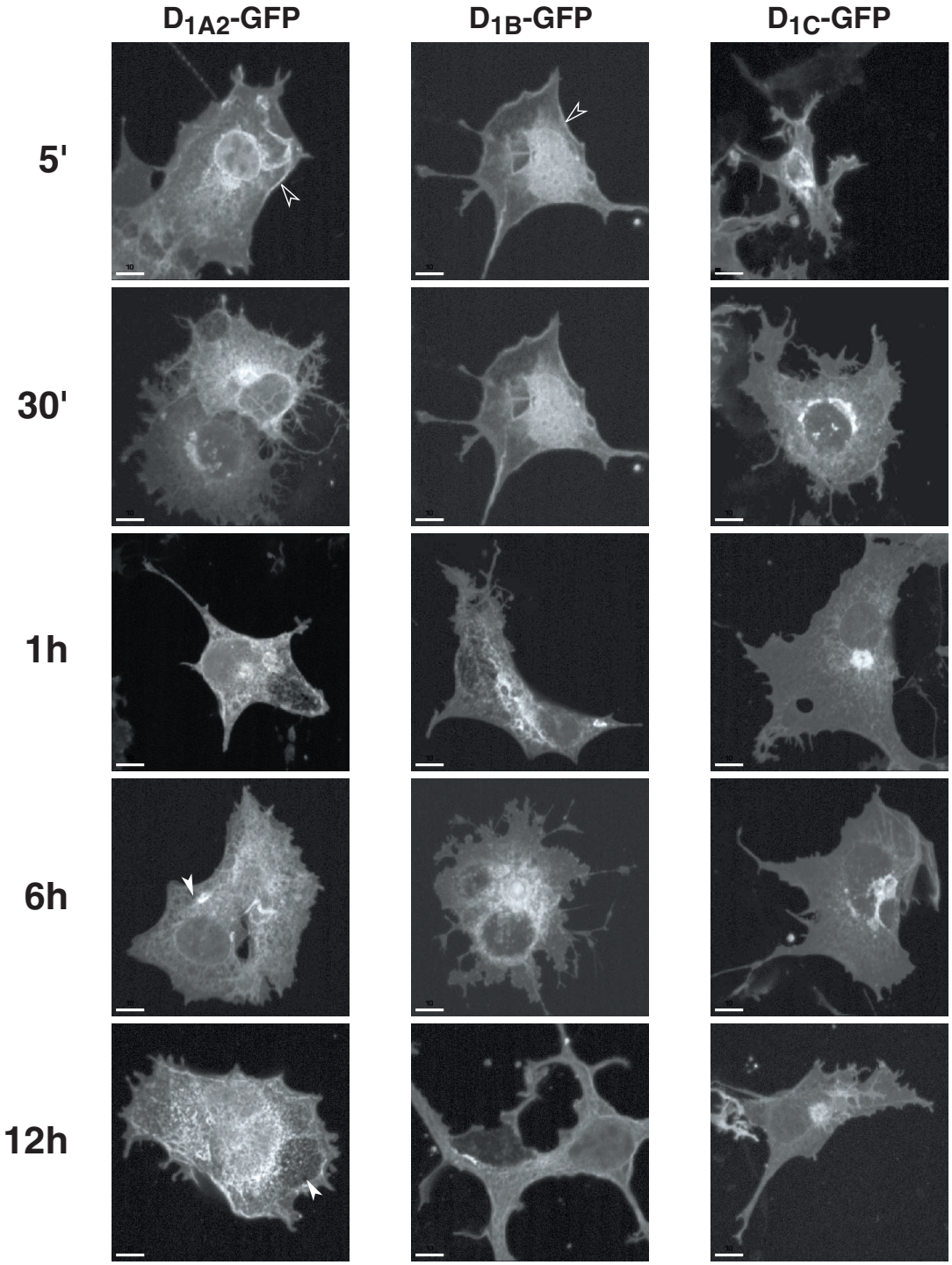


Figure 46 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation des protéines de fusion D_1-GFP dans les cellules COS-7.

La fluorescence de la GFP a été utilisée pour suivre la localisation cellulaire des sous-types du récepteur D_1 lors de la désensibilisation effectuée dans les mêmes conditions que pour les dosages biochimiques (Figure 27). Les cellules COS-7 expriment de façon transitoire les récepteurs D_1 après électroporation. Dans certain cas, le traitement à court terme par l'apomorphine intensifie le marquage de la GFP à la membrane (flèches creuses). Après une plus longue période, le marquage disparaît ou diminue fortement à la périphérie cellulaire (flèche pleine). La barre correspond à 10 µm.

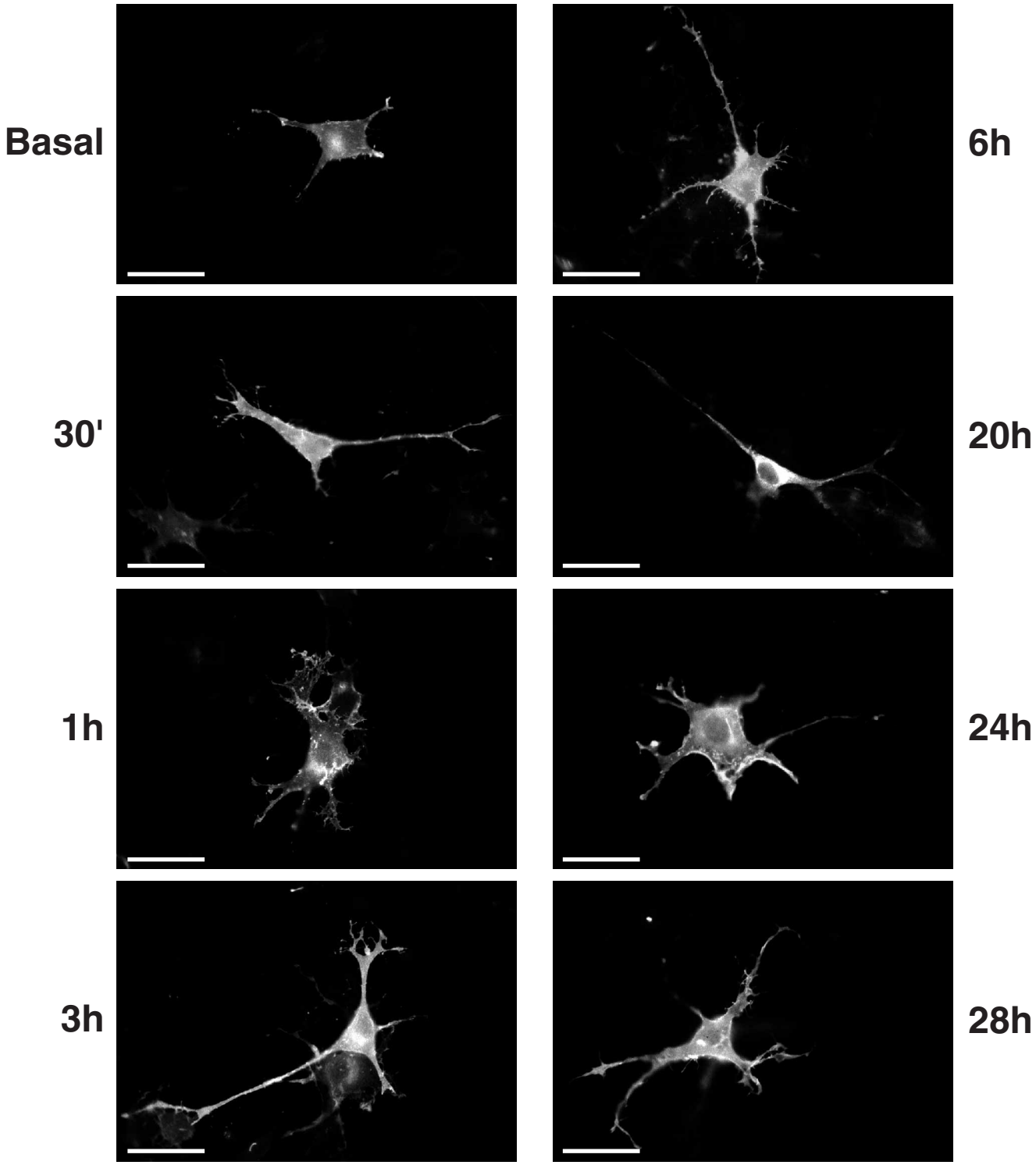


Figure 47 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation du récepteur D_{1A2}-GFP dans les cellules 13.S.1.24.

La fluorescence de la GFP a été utilisée pour suivre la localisation cellulaire du sous-type D_{1A2}, au microscope à fluorescence, lors de la désensibilisation effectuée dans les mêmes conditions que pour les dosages biochimiques (Figure 27), pour les temps indiqués ci-dessus. Les cellules 13.S.1.24 expriment de façon transitoire le récepteur D_{1A2}-GFP, après électroporation. La barre correspond à 10 µm.

D_{1C}-GFP, dans aucune des conditions que nous avons utilisées. Ce résultat est en accord avec les mesures fonctionnelles obtenues lors de l'étude biochimique de la désensibilisation des récepteurs.

V.A.2. Observation de la localisation des constructions D_1-GFP dans la lignée 13.S.1.24

Comme pour le dosage biochimique, nous voulions vérifier qu'il n'existait pas de particularité des cellules fibroblastiques COS-7 pour le comportement des récepteurs D_1 activés par l'apomorphine. Pour cela nous avons transfecté le sous-type D_{1A2}-GFP dans la lignée cellulaire 13.3.1.24 qui dérive de neurones de la muqueuse olfactive du rat. Le récepteur D_{1A2}-GFP ne semble pas, comme dans les cellules COS-7, être capable de modifier de façon massive sa localisation à la surface de la cellule après un traitement par un agoniste (Figure 47). La faible surface du cytoplasme rend aussi les observations assez difficiles. Cependant on ne remarque aucun regroupement de récepteurs à la surface de la cellule ni d'augmentation du marquage dans les vésicules intracellulaires, toujours masquées visiblement par la voie de sécrétion. Nous avons prolongé le traitement des cellules jusqu'à 28 heures, et même après ce délai, le marquage du récepteur est toujours présent à la surface de la cellule. Il semble donc que les observations effectuées pour les cellules COS-7 sont identiques à celles que l'on peut faire dans d'autres types cellulaires plus proche des neurones, et que cette faible modification de la localisation des récepteurs D_1-GFP sous l'effet d'un agoniste est générale.

V.A.3. Analyse des effets de différents composés sur les récepteurs D_1

Il est possible que l'utilisation de l'apomorphine dans nos analyses n'ait pas permis de mettre en évidence correctement l'internalisation des récepteurs D_1. Nous avons donc testé un ensemble de molécules pour tenter d'obtenir des modifications de la répartition membranaire de ces récepteurs fusionnés à la GFP (Figure 48). Cependant, l'utilisation de la dopamine ou du SKF-38393 n'entraîne pas plus de modification de la localisation membranaire des récepteurs. Avec ces deux agonistes des récepteurs D_1, comme avec l'apomorphine, la localisation des récepteurs reste globalement membranaire avec un fort marquage de la voie de sécrétion. Nous avons aussi testé un agoniste inverse le (+)-butaclamol afin de regarder si ce composé ne modifiait pas la répartition du récepteur D_{1B}-GFP constitutivement activé. Comme pour les autres drogues testées, le (+)-butaclamol ne modifie pas non plus la localisation membranaire des récepteurs D_1. Enfin nous nous sommes servi de la forskoline, activateur de l'adénylate cyclase, dans le but d'induire une désensibilisation “hétérologue” des récepteurs D_1 par l'intermédiaire de

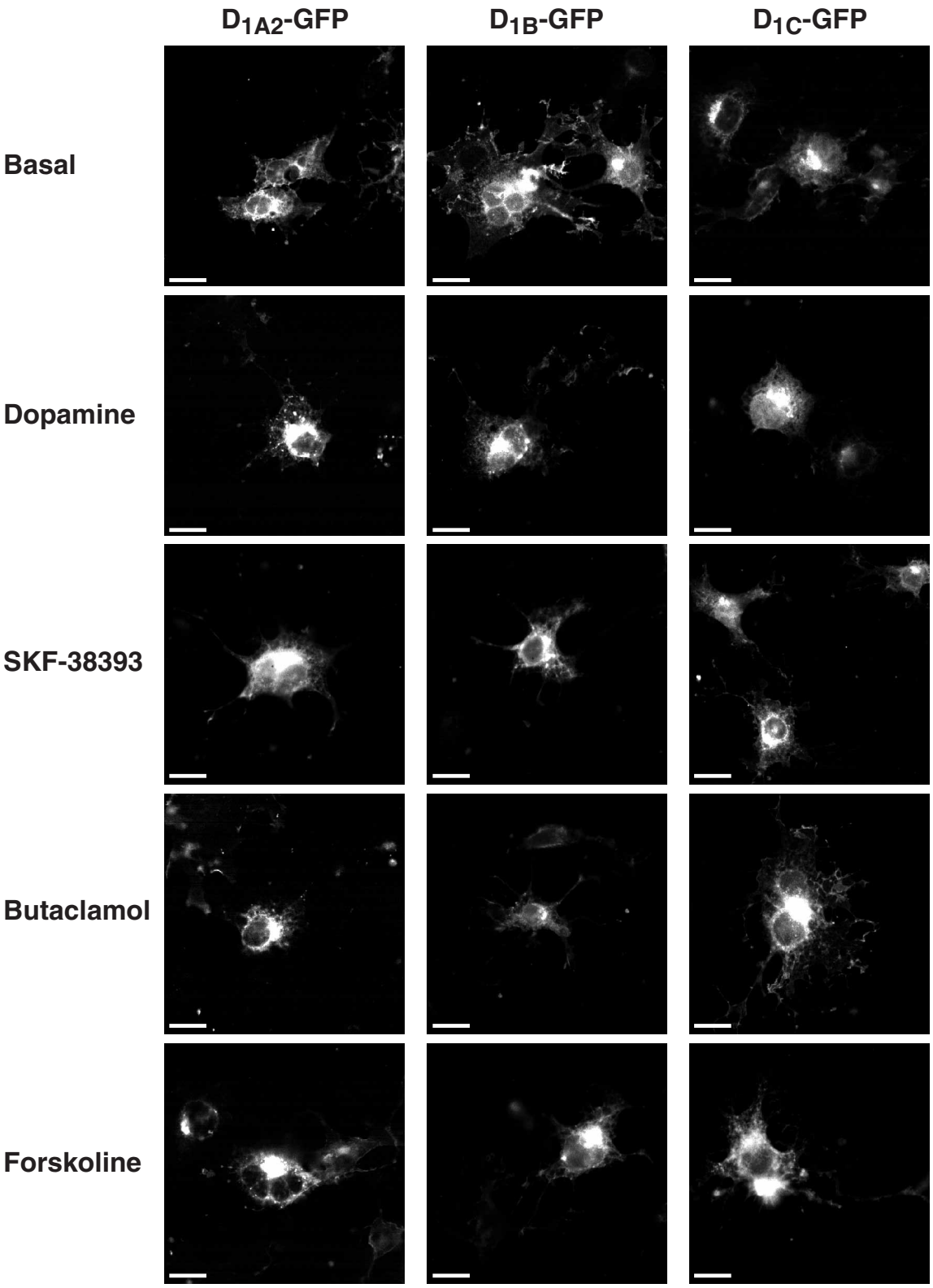


Figure 48 : Tests de différents composés sur la désensibilisation des récepteurs D_1-GFP dans les cellules COS-7.

La fluorescence de la GFP a été utilisée pour suivre la localisation cellulaire des récepteurs D_1-GFP, en microscopie à fluorescence, en présence de différents composés à une concentration finale de 10 µM pendant 15 minutes. Les cellules COS-7 expriment de façon transitoire les sous-types du récepteur D_1 , après électroporation. La barre correspond à 10 µm.

la PKA puisque nous avions observé un effet sur la désensibilisation des récepteurs D_1, évalué par l'accumulation d'AMPc. Dans cette situation non plus, aucune internalisation ni regroupement de récepteurs n'est observable à la membrane plasmique.

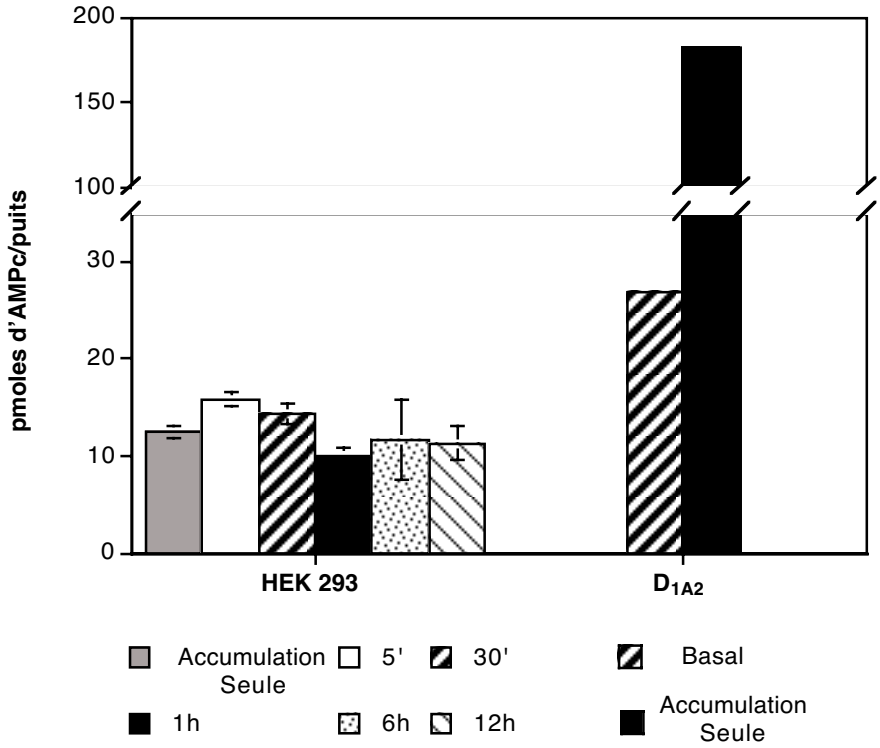


Figure 49 : Variations d'accumulation d'AMPc dans les cellules HEK 293 sans récepteurs D_1.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues, en traitant les cellules HEK 293 non transfectées, de la même façon que précédemment (Figure 27). Les temps d'incubation sont indiqués en dessous du graphique. A titre de comparaison, les valeurs obtenues lorsque le récepteur D_{1A2} est transfecté dans les cellules COS-7 sont données avec (stimulation maximale) ou sans (basal) stimulation à la dopamine de 15 minutes. Ce graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type, sauf pour le récepteur D_{1A2}, où les valeurs sont données à titre indicatif.

V.B. Lignées stables exprimant les constructions D_1-GFP

V.B.1. Obtention des lignées stables dans les cellules HEK 293

Afin de mieux contrôler les taux d'expression des récepteurs D_1-GFP et éviter au maximum ces phénomènes de marquage de la voie de sécrétion lors des transfections transitoires, nous avons décidé de fabriquer des lignées stables exprimant chacun des sous-type du récepteur D_1 fusionnés à la GFP. Nous avons opté pour les cellules HEK 293 pour réaliser ces lignées. En effet, il est impossible de sélectionner les cellules COS-7 par la néomycine. De plus,

	Scatchard		Saturation	
Clone	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg de protéines)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg de protéines)
D_{1A}-GFP				
14	47,01	483,22	33,47	456,47
37	130,10	1143,86	181,36	1221,57
42	82,34	1302,77	120,90	1388,52
26	72,10	2399,34	46,65	2087,74
9	83,25	2635,57	57,05	2285,52
36	93,15	2979,72	84,60	2903,74
48	610,66	10319,31	134,60	5438,40
44	480,10	20375,49	253,50	15435,30
40	402,92	22891,31	323,00	20851,80
27	343,33	15347,03	1340,41	57987,63
D_{1B}-GFP				
12	83,13	2804,04	61,14	2473,34
9	173,93	4936,58	103,85	3595,45
26	246,61	7228,63	192,89	6077,70
D_{1C}-GFP				
30	25,07	75,63	3,80	53,97
5	110,81	2538,58	57,70	2210,97
17	56,82	4533,20	31,51	3637,35
8	164,18	4891,80	62,56	3677,85
6	99,53	4416,88	52,98	3732,76
9	173,77	6164,17	57,35	4217,83
40	490,99	4866,43	25,60	4442,70
3	86,02	5783,72	53,11	5049,60
28	78,96	10132,52	53,83	9176,10
23	197,22	17626,78	44,74	9584,70
35	424,33	26489,27	114,71	14113,80
32	457,36	30421,83	107,47	14629,20
29	226,73	24823,74	91,17	16799,00
18	139,65	18934,15	136,29	18489,90

Tableau 17 : Récapitulatif des différents clones de cellules HEK 293 exprimant de façon stable chacun des sous-types fusionné à la GFP.

Les valeurs de Kd et Bmax obtenues après dosage de la liaison à l'équilibre des récepteurs sont représentées selon deux méthodes de calcul. Les clones testés pour chaque récepteur sont représentés dans l'ordre croissant de leur valeur de Bmax mesuré par approximation mathématique. En grisé sont représentés les récepteurs choisis pour la suite des expériences.

comme les cellules COS-7, les cellules HEK 293 possèdent de nombreuses caractéristiques intéressantes. Comme la plupart des lignées fibroblastiques elles sont faciles à cultiver et elles disposent d'un cytoplasme étalé propice à une observation cytologique précise et comme dans les cellules COS-7. Les protéines GRK qui interviennent dans la désensibilisation y sont faiblement exprimées (Freedman *et al.*, 1995), ce qui facilitera les analyses de surexpression de ces protéines. Enfin, certaines études récentes ont été effectuées pour les récepteurs de la dopamine dans les cellules HEK 293 (Vickery et von Zastrow, 1999) et pourrait servir de comparaison. Le test de la désensibilisation réalisé dans ces cellules contrôle ne montre, comme pour les cellules COS-7, aucune activation par les agonistes dopaminergiques, ni de désensibilisation intrinsèque (Figure 49).

Il a fallu effectuer un grand nombre de séries d'isolements de cellules afin d'obtenir des clones uniques exprimant le récepteur à des taux proches pour chacun des sous-types. Lors de la première série de sélection, une partie des clones clones avaient intégré le récepteur D_{1A2} (mesuré par liaison spécifique) mais pas la GFP (invisible en fluorescence), alors que d'autres clones ont perdu leur insert au cours des manipulations. Finalement, les différents clones isolés et les paramètres obtenus par liaison de ligands radiomarqués sont indiqués sur le Tableau 17. Nous avons choisi de conserver trois clones exprimant les récepteurs D_1 fusionnés à la GFP autour de 3000 fmoles par mg de protéines.

V.B.2. Observation de la localisation des récepteurs D_1-GFP dans les lignées stables

L'observation en microscopie confocale de ces clones à l'état basal montre que l'on a une nette diminution du marquage de la voie de sécretion, ce que nous voulions obtenir (Figure 50), et toujours un marquage à la membrane plasmique. En revanche, il n'y a pas de différences visibles entre les sous-types du récepteur D_1.

Avec ces clones, nous avons examiné la localisation des récepteurs lors de la désensibilisation. L'anlyse rapide des profils de désensiblisation biochimique ne montre pas de différence par rapport à celui obtenu dans les cellules COS-7 (données non montrées). Cependant, comme pour les transfections transitoires, les résultats obtenus en microscopie confocale n'ont pas montré de modifications significatives du marquage membranaire (Figure 51). Aucune internalisation ou regroupement de récepteurs n'est observé, même si la diminution importante du marquage de la voie de sécrétion permet de mieux visualiser le réseau intracellulaire de vésicules. Après 12 heures de traitement à l'apomorphine, nous ne pouvons toujours pas visualiser d'internalisation. Une hypothèse possible avec toutes ces indications est que la modification en C-terminale des récepteurs D_1-GFP ait pu altérer les propriétés d'internalisation des récepteurs sans toucher à leur capacité de découplage des protéines G et des

voies de signalisation. Cependant avec toutes les données obtenues, il semble plus probable qu'en fait pour les récepteurs D_1 de la dopamine, l'internalisation des récepteurs ne joue qu'un rôle minime dans la désensibilisation des récepteurs.

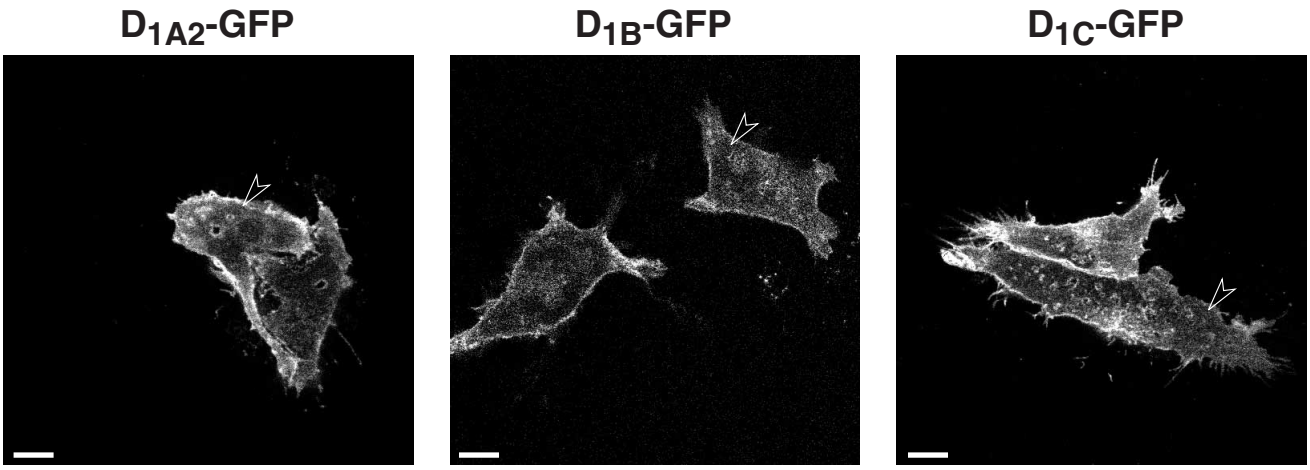


Figure 50 : Distribution des protéines de fusion D_1-GFP dans les lignées stables HEK 293.

La distribution des récepteurs D_1-GFP a été observée par microscopie confocale dans les lignées stables HEK 293. Les trois sous-types D_{1A2}, D_{1B} et D_{1C} sont présents à la membrane plasmique (flèche). La barre correspond à 10 µm.

V.B.3. Visualisation des récepteurs D_1-GFP par western blot

La réalisation de western blot contre les récepteurs D_1 se heurte à plusieurs problèmes. La solubilisation des récepteurs n'est pas une technique très facile car il faut éviter la formation de macro-complexes moléculaires par association des domaines hydrophobes d'un très grand nombre de récepteurs (pour revue voir Haga *et al.*, 1990). Toutefois, les premiers essais de solubilisation (Niznik *et al.*, 1986) indiquent que les récepteurs conservent leurs propriétés après solubilisation par la digitonine. Nous avons donc utilisé ce produit, ajouté au tampon de lyse pour solubiliser les récepteurs. Les premières expériences effectuées sur des extraits membranaires à partir de cellules transfectées n'ont pas permis de visualiser les récepteurs autrement qu'à l'extrémité supérieure du gel (Figure 38B). Le test de nombreuses conditions n'a jamais permis de voir ces récepteurs “rentrer” dans le gel. En fait, grâce au lignées stables, il a

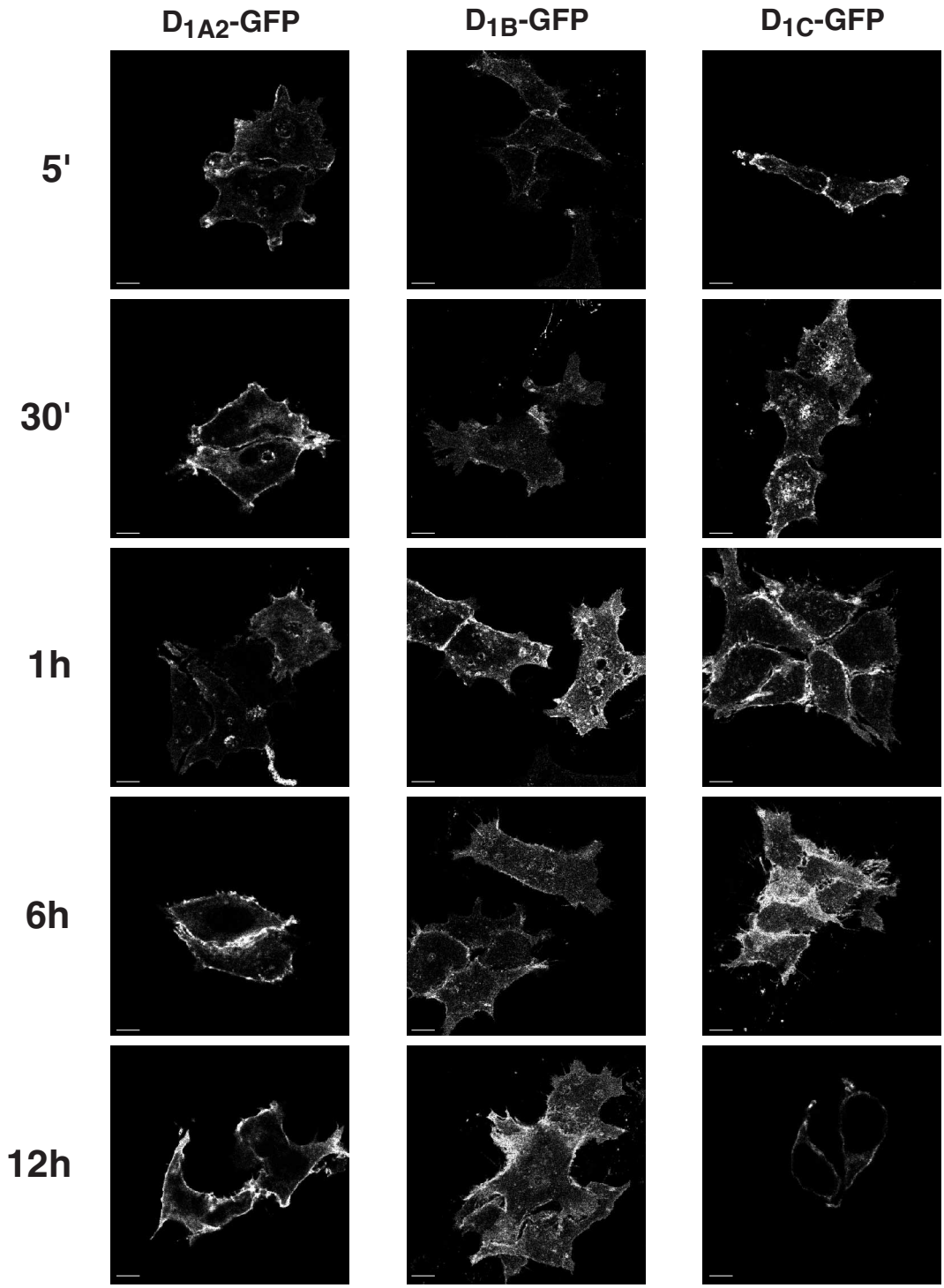


Figure 51 : Corrélations morphologiques de la désensibilisation des protéines de fusion D_1-GFP dans les lignées stables HEK 293.

La fluorescence de la GFP a été utilisée pour suivre la localisation cellulaire des sous-types du récepteur D_1 lors de la désensibilisation effectuée dans les mêmes conditions que pour les dosages biochimiques (Figure 27). Les cellules HEK 293, observées en microscopie confocale, expriment de façon stable les récepteurs D_1 fusionnés à la protéine GFP. La barre correspond à 10 µm.

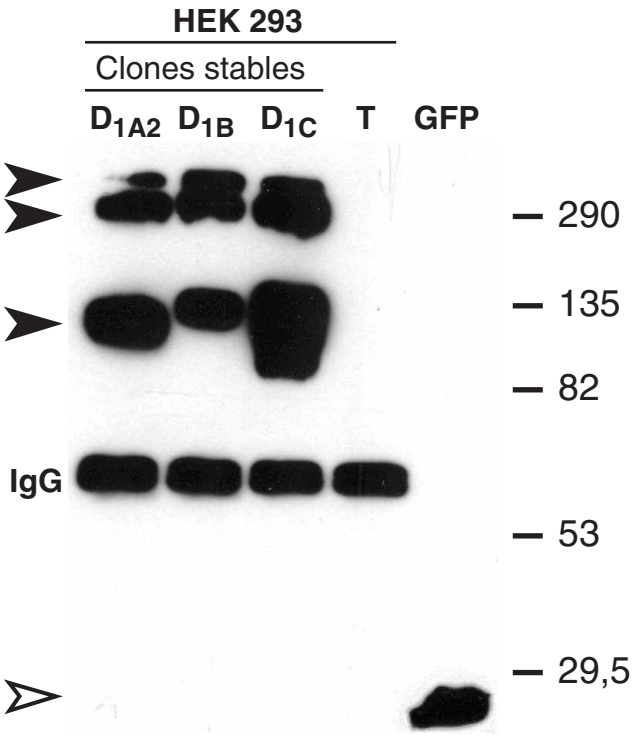


Figure 52 : Western blot des récepteurs D_1 fusionnés à la GFP, révélés par un anticorps anti-GFP après immunoprécipitation de la GFP.

Des extraits de cellules HEK 293 exprimant de façon stable les récepteurs D_1-GFP sont immunoprécipitées par un anticorps anti-GFP et de la protéine G sépharose. Après migration sur un gel SDS-PAGE, les récepteurs sont révélés par le même anticorps dilué au 1/1000e. Des extraits de cellules HEK 293 ne contenant pas de récepteurs (T) sont déposés en même temps que les extraits de cellules HEK 293 transfectées par le plasmide pEGFP-N1 (GFP). Les flèches pleines correspondent aux récepteurs et la flèche creuse à la GFP. La bande autour de 60 kDa correspond aux immunoglobulines.

été possible d'obtenir de grandes quantités de protéines et d'effectuer ainsi des immunoprécipitations des récepteurs fusionnés à la GFP. Après immunoprécipitation il a été possible d'observer les trois sous-types du récepteur D_1 sur des membranes après western blots (Figure 52). On peut ainsi remarquer que chaque récepteur existe sous plusieurs formes multimériques et qu'il n'y a pas dans ces lignées d'expression de la protéine GFP seule. Les tailles observées sont celles qui sont attendues pour des récepteurs (60 kDa) fusionnés à la GFP (27 kDa) et glycosylés. De plus, on n'observe pas non plus de forme de dégradation de ces récepteurs. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir les mêmes résultats en immunoprécipitant les récepteurs avec l'anticorps monoclonal P5D4 reconnaissant spécifiquement l'étiquette VSV-G.

V.C. Les méthodes d'étude in vivo

Les nombreux avantages de la GFP comme marqueur cellulaire en ont fait un outil idéal pour les analyses *in vivo*. Elle a été ainsi utilisée par exemple pour visualiser les neurones de la souris après micro-injection ou après transgenèse (Van den Pol et Ghosh, 1998). De même, la GFP a été employée avec succès pour son expression dans l'embryon du poisson danio (zebrafish). Les taux de réussites après micro-injection sont assez importants lorsque l'on utilise l'ARNm codant pour la GFP (Peters *et al*., 1995). Comme nous utilisons des récepteurs D_1 de poisson pour ces études sur la désensibilisation, nous avons essayé d'utiliser ces techniques d'expression afin de visualiser *in vivo* les récepteurs D_1 fusionnés à la protéine GFP. Nous avons employé comme modèle le poisson médaka qui comme le danio est un bon outil génétique mais qui n'a visiblement pas été affecté par la duplication complète du génome qui a touché le danio (Postlethwait *et al*., 1998). Comme nous ne voulions pas une expression trop large, nous ne nous sommes pas servi de la micro-injection de l'ARNm de chacune des constructions mais plutôt celle du vecteur d'expression linéarisé (Dynes et Ngai, 1998). Malgré les 200 œufs de médaka microinjectés avec la construction D_{1A2}-GFP, nous n'avons pas pu observer un seul marquage spécifique des cellules de l'embryon. A chaque fois qu'une région semblait présenter une fluorescence GFP, elle était reléguée dans le vitellus sans continuer à se développer (données non montrées).

Parallèlement à cette recherche d'un mode d'expression de nos constructions *in vivo*, nous avons essayé d'exprimer ces chimères dans un modèle de culture primaire afin de confirmer nos mesures biochimiques et d'accéder à une visualisation dans un modèle cellulaire neuronal. Le problème de l'utilisation des cultures primaires provient de leur difficulté à être transfectées. Nous avons opté pour l'utilisation des cultures primaires de neurones de striatum afin, d'une part d'obtenir des conditions de cultures déjà bien connues et d'utiliser une région dans laquelle les récepteurs D_1 étaient exprimés naturellement. Classiquement, la transfection au phosphate de calcium des neurones en culture de striatum ne donne pas plus de 5% de neurones transfectés (Watanabe *et al*., 1999). Nous avons donc employé des composés lipidiques commerciaux comme le fugène 6 (Roche) ou l'effectene et le superfect (Qiagen), pour améliorer ces rendements. Ces méthodes, comme l'électroporation, ne nous ont permis de ne visualiser pour le moment que des cellules gliales transfectées et encore en très faible proportion (autour de 1%). Toutefois, grâce à ces cultures primaires, il a été possible de valider nos observations biochimiques. En effet, en effectuant les mêmes dosages d'accumulation d'AMPc sur les cultures primaires, on peut observer un profil de désensibilisation très proche de celui du D_{1A} ou du D_{1B} (Figure 53). On arrive ainsi à observer une désensibilisation en deux phases comme celle du récepteur D_{1A} (le plus abondant dans le striatum). En fonction des agonistes utilisés, on peut

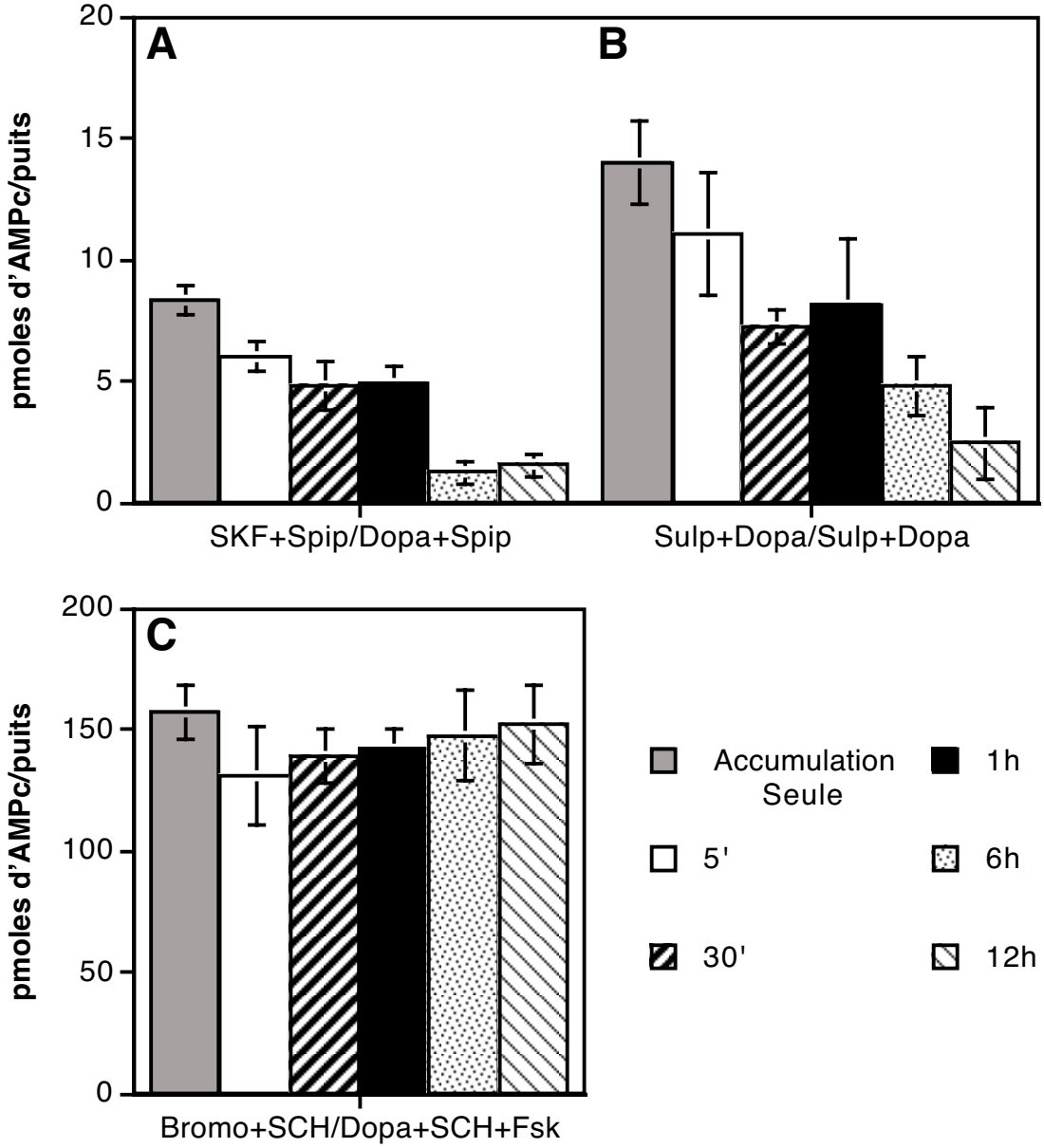


Figure 53 : Dosage de l'accumulation d'AMPc dans des cultures primaires de neurones de striatum.

Les mesures d'accumulation de l'AMPc ont été obtenues de la même façon que pour les cellules COS-7 (Figure 27). Les différents temps de prétraitement sont notés ci-dessus. Les composés utilisés sont indiqués en dessous de chaque condition avec en premier ceux qui sont employés lors du prétraitement et ensuite ceux qui le sont lors de la stimulation. Les concentrations utilisées sont de 10 μM pour la forskoline, la dopamine, les agonistes D_1 (SKF-38393), D_2 (Bromocriptine), les antagonistes D_1 (SCH-23390) et D_2 (Spipérone et Sulpiride). La dopamine est toujours dilué dans l'acide ascorbique à 0,1%. Les cultures primaires proviennent d'animaux au stade embryonnaire E17 (**B**) ou venant de naître P4 (**A**) et P5 (**C**). Chaque graphique est la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune effectuée en double. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type.

remarquer des modifications dans les niveaux d'activation maximale (Figure 53A et B). Ainsi, avec la dopamine, on obtient une forte activation alors qu'elle est à peu près deux fois moins forte pour le SKF-38393. Cette activité agoniste partielle est observable dans ces conditions alors que dans les cellules transfectées nous n'avons pas pu la voir. Il faut tout de même constater que les valeurs générales des taux d'accumulation d'AMPc sont très faibles par rapport à ce que nous obtenions dans les cellules hétérologues. En revanche, si l'on observe bien une activation des récepteurs D_1, il n'a pas été possible d'observer l'activation des récepteurs D_2 avec la bromocriptine après traitement à la forskoline en présence d'un antagoniste D_1 (Figure 53C). Les récepteurs D_2 sont capables d'inhiber l'adénylate cyclase après leur activation. Lors d'un traitement avec la bromocriptine, un agoniste des récepteurs D_2, l'accumulation d'AMPc produite par l'activation de l'adénylate cyclase par la forskoline devrait donc diminuer, ce que nous n'avons pas pu observer. Ces expériences indiquent tout de même que les cultures primaires de neurones de striatum sont un bon modèle pour poursuivre les analyses biochimiques, même si la transfection du récepteur D_{1A2}-GFP n'a pas modifié l'amplitude des valeurs d'accumulation d'AMPc.

En conclusion, si visiblement les constructions D_1-GFP sont correctement localisées à la membrane plasmique, elles ne permettent pas d'observer de phénomènes d'internalisation. Les nombreux contrôles effectués laissent penser que ce phénomène est caractéristique des récepteurs D_1 de la dopamine. De plus le développement d'outils *in vivo* reste encore à poursuivre.

VI. Étude des modifications des voies de signalisation des MAP Kinases

Une conclusion que l'on pouvait tirer de nos expériences précédentes est que le récepteur D_{1C} possède des caractéristiques bien particulières. Son absence de désensibilisation, ajoutée à une localisation anatomique plus que restreinte jette le doute sur son rôle physiologique. Est-ce un récepteur fonctionnel ? Dans le but de chercher d'autres preuves de sa fonctionnalité, nous avons analysé les voies de couplage des récepteurs aux voies de transduction connues des MAPK. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, un certain nombre de données indiquent que la dopamine pourrait jouer un rôle de facteur de croissance. De plus, certaines expériences ont montré avec les récepteurs D_1 une activation de certaines voies MAPK. Pour vérifier ces hypothèses nous avons entrepris une analyse comparée de l'activation de ces voies en fonction des sous-types du récepteur D_1.

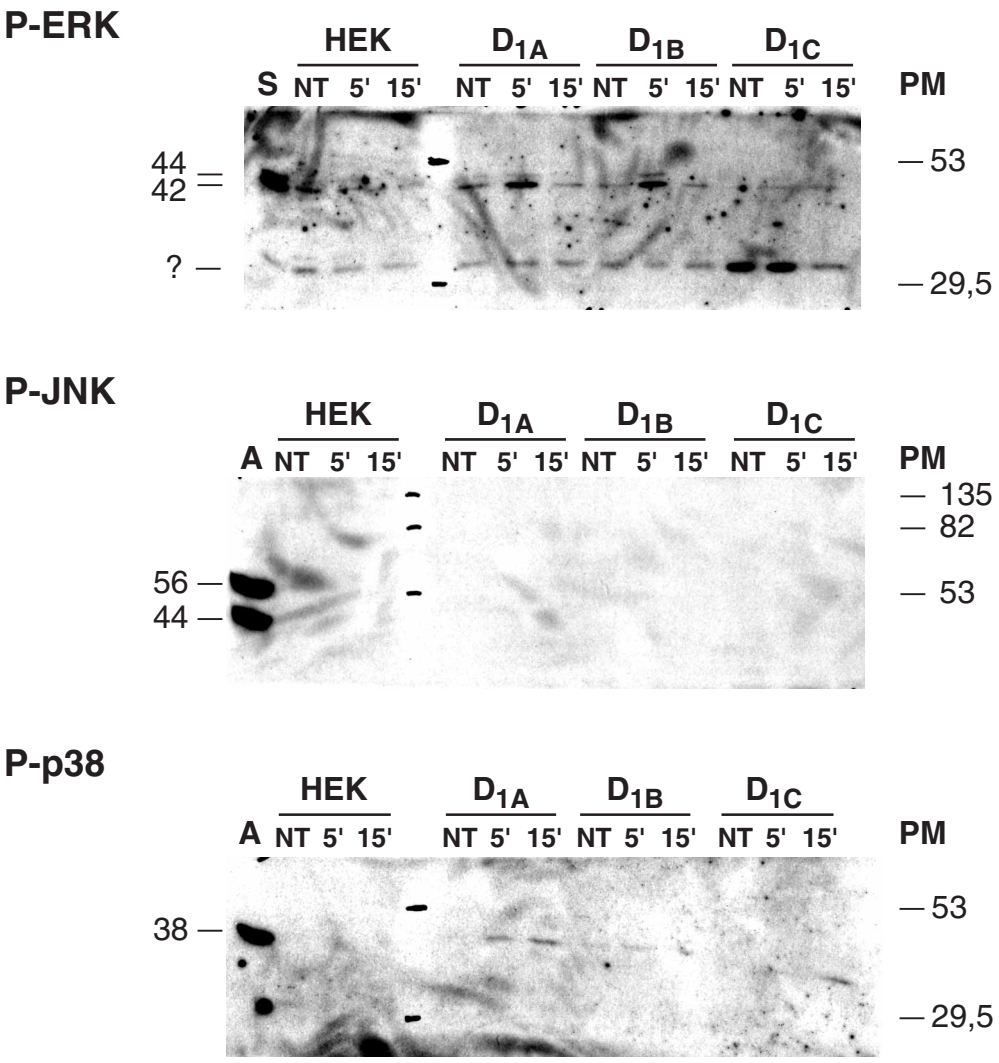


Figure 54 : Western blot des différentes voies MAPK phosphorylées (ERK, JNK et p38), après activation des cellules HEK 293 sauvages et lignées stables contenant les sous-types du récepteur D_1-GFP.

Seize heures avant les traitements, les cellules sont privées de sérum et l'on rajoute de la BSA 0,3% dans le milieu de culture. Ensuite, les protéines cytoplasmiques sont récupérées avec ou sans (NT) traitement de 5 et 15 minutes avec du SKF-38393 (10 µM). Des témoins positifs sont effectués pendant 15 minutes en présence de sérum (S, pour ERK) ou d'anisomycine 1 µg/ml pendant 30 minutes (A, pour JNK et p38). Après migration sur un gel SDS-PAGE de 15 µg de protéines pour ERK et JNK et de 30 µg pour p38, les membranes sont révélées par des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de ERK (Promega dilué au 1/1000e), JNK (NEB dilué au 1/750e) et p38 (NEB dilué au 1/100e). Les poids moléculaires (PM) indiqués à gauche sont ceux des protéines à analyser.

VI.A. Profils de phosphorylation des voies des MAPK par les récepteurs D_1

Parmi les récepteurs de la dopamine, les récepteurs de la classe D_1 sont positivement couplés à l'adenylate cyclase et leur activation entraîne une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Cette augmentation est connue pour activer de façon directe ou indirecte les voies des MAPK. Nous avons donc testé par western blot la présence des formes phosphorylées actives des trois principales voies des MAPK : ERK, JNK et p38 (Figure 54). Pour la voie la plus classique, ERK, on remarque que l'on a une activation dès 5 minutes pour les récepteurs D_{1A2} et D_{1B}. Cette activation est rapide et transitoire, puisque qu'à 15 minutes de traitement au SKF-38393, on constate que l'intensité de la bande n'est plus aussi forte. Le récepteur D_{1C} ne semble pas activer cette voie. Cependant, on retrouve une protéine de masse apparente de 30 kDa qui est activée de façon basale et après 5 minutes de traitement avec une forte intensité, dans le cas du récepteur D_{1C}. Cette bande est activée dans toutes les autres conditions à des taux faibles. Pour JNK, on ne constate aucun marquage spécifique sur la membrane pour aucun des sous-types du récepteur D_1. Enfin la dernière voie p38 donne un marquage très faible qui augmente vers 15 minutes pour les récepteurs D_{1A} et D_{1B}.

S'il semble certain que la dopamine a un rôle de facteur de croissance au cours du développement du système nerveux, le mécanisme précis de son mode d'action est encore inconnu. Si les effets de la stimulation des récepteurs D_1 ont déjà été observés à l'échelle des voies de signalisation intracellulaire p38 et JNK, leur rôle reste encore à préciser et principalement dans les cascades d'activation ERK. De plus, dans le cerveau des vertébrés, les protéines B-Raf et Raf-1 semblent jouer un rôle central dans les cascades de régulation des MAPK. L'augmentation du taux d'AMPc a été montrée comme responsable de l'activation de B-Raf et de l'inhibition de Raf-1. Nous voulons analyser les mécanismes par lesquels les récepteurs D_1 qui provoquent l'activation de l'adenylate cyclase et la production d'AMPc sont capables de moduler l'activation différentielle des voies MAPK dans les neurones. L'existence de sous-types du récepteur D_1 aux propriétés différentes en font d'excellents modèles des modulations possibles des voies MAPK. Enfin, l'existence d'une forme constitutivement active naturelle (D_{1B}) et la compréhension de son mode d'activation des voies de signalisation pourrait être utile pour appréhender les mécanismes généraux de transformation cellulaire provoqués par les formes mutées actives de certains récepteurs couplés aux protéines G.

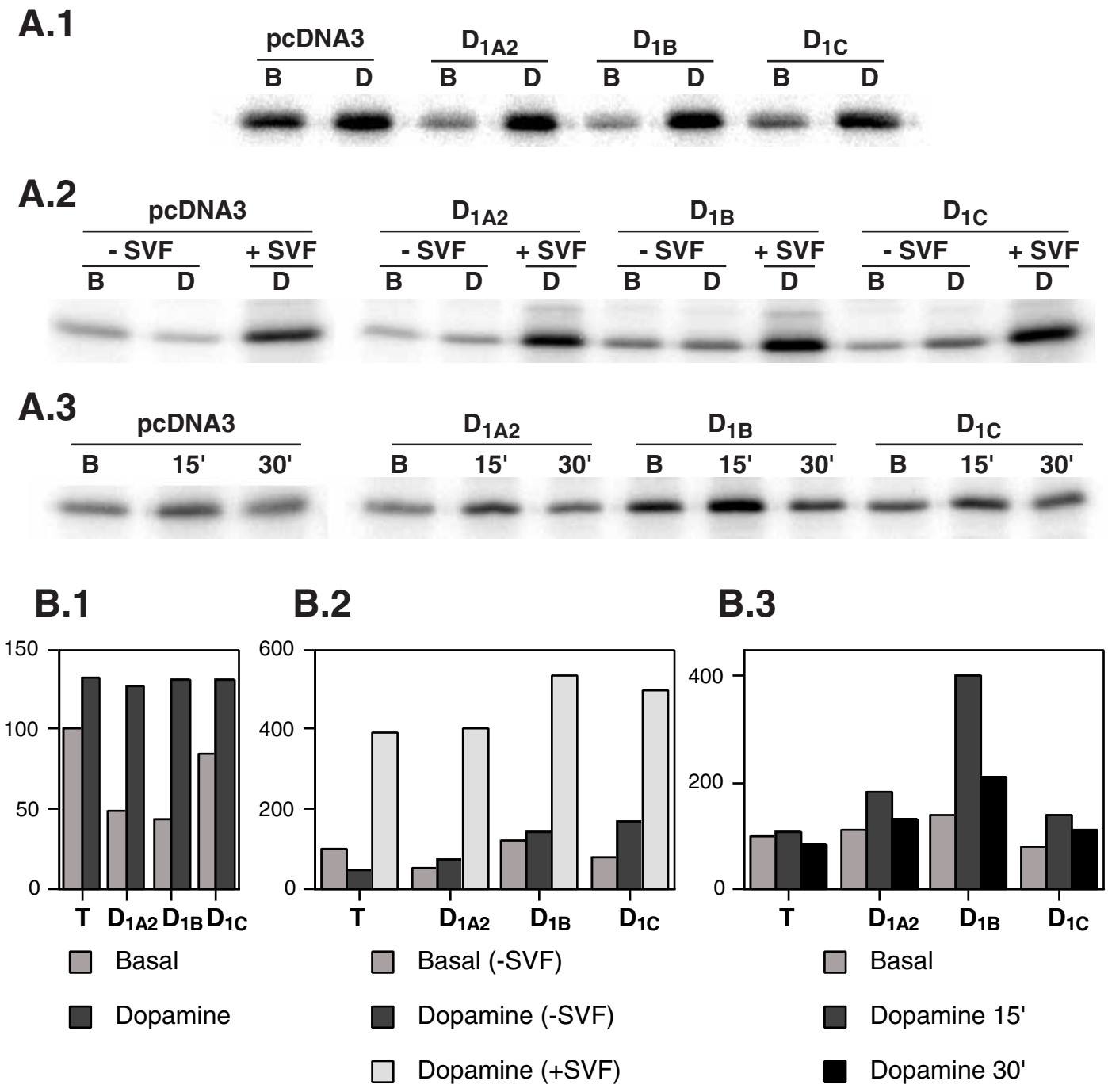


Figure 55 : Dosage de l'activité des MAPK (ERK1) dans les cellules COS-7 après électroporation des récepteurs D_1.

Le principe du dosage est décrit dans les méthodes. Après traitement, la MAPK est immunoprécipité grâce à son étiquette HA dans les surnageants de lysats cellulaires. On effectue alors *in vitro* le test d'activité kinase et l'on dépose les échantillons sur gel. L'autoradiographie est révélée au Phosphor Imager (A) pour isoler la bande correspondant au substrat Elk. Ensuite la quantification (B) est normalisée par la quantité de protéine chargée et les valeurs du dosage ßgalactosidase représentatif de l'efficacité de transfection. Les valeurs sont rapportées au témoin (T) basal. **1.** Les cellules en présence de sérum sont traitées (Dopamine, D) ou non (Basal, B) avec 10 µM de dopamine pendant 15 minutes. **2.** Les cellules sont traitées comme pour 1 avec (+SVF) ou sans (-SVF) sérum. **3.** Les cellules sont traitées comme pour 1 et la dopamine est appliquée pendant 15 ou 30 minutes. Un témoin avec le plasmide vide (pcDNA3, T) est effectué dans chaque expérience.

VI.B. Évolution de l'activité des MAPK au cours de la désensibilisation des récepteurs D_1

Nous avons donc cherché à analyser l'activité de ERK1 après cotransfection d'une forme étiquetée HA avec chacun des sous-types du récepteur D_1 dans les cellules COS-7. Après traitement, la protéine étiquetée est immunoprécipitée et son activité est dosée *in vitro* à l'aide d'un substrat spécifique, le facteur de transcription Elk. Les premiers tests de validation de la technique ont montré que l'activité de ERK1 était plus forte à l'état basal dans les cellules non transfectées que dans les cellules électroporées avec les D_1 (Figure 55A). Par contre, l'activation par la dopamine permet de retrouver un état identique dans toutes les cellules quelles que soient les conditions. Ces premières expériences ont été effectuées en présence de sérum dans le milieu de culture. Il est donc possible que les récepteurs D_1 soient capables d'inhiber l'activation basale du sérum sur les cellules. En absence de sérum dans le milieu (remplacé par de la BSA 0,3%) il est assez difficile de visualiser une activation spécifique des récepteurs D_1 (Figure 55B). Dans tous les cas, il semble y avoir une légère augmentation de l'activité de ERK1 même pour le récepteur D_{1C}. Ce résultat est différent de ceux que nous avions observés auparavant (Figure 54), mais les conditions de mesures sont très dissemblables et les variations entre les niveaux de base et activés sont très faibles. Nous avons donc continué à effectuer ces expériences en présence de sérum dans le milieu. Afin d'analyser l'activation de ERK1 au cours de la désensibilisation des récepteurs D_1, nous avons effectué deux temps de traitement de 15 et 30 minutes (Figure 55C). On remarque alors que le profil général d'activation est le même pour chaque récepteur avec uniquement une modification de l'amplitude. L'activité de ERK1 augmente après 15 minutes de traitement puis baisse à 30 minutes. L'amplitude est forte pour le récepteur D_{1B} et plus faible pour le récepteur D_{1A2} et D_{1C}. Par contre ces variations sont inexistantes chez le témoin.

Afin d'approfondir l'analyse de la désensibilisation, nous avons augmenté le nombre de périodes de mesure de 5 minutes à 2 heures et continué les expériences en absence de sérum pour éviter d'intervenir sur les voies des MAPK de façon non spécifique. Dans ces conditions, il est important de regarder le gel dans sa totalité (Figure 56). Sur cette autoradiographie, on constate que la bande correspondant au substrat Elk n'est aisément visible que pour le témoin positif (activé par le sérum). Par contre, d'autres bandes sont visibles et modulées de façon différente en fonction du temps de traitement des cellules à la dopamine et en présence de propranolol et de CGS-15493. Trois bandes sont clairement modifiées dont les poids moléculaires sont autour de 30, 50 et 70 kDa. Au cours du temps, l'intensité de ces trois bandes varie plus fortement que pour celles du substrat Elk (Figure 57). La bande la plus haute possède un profil proche pour chacun

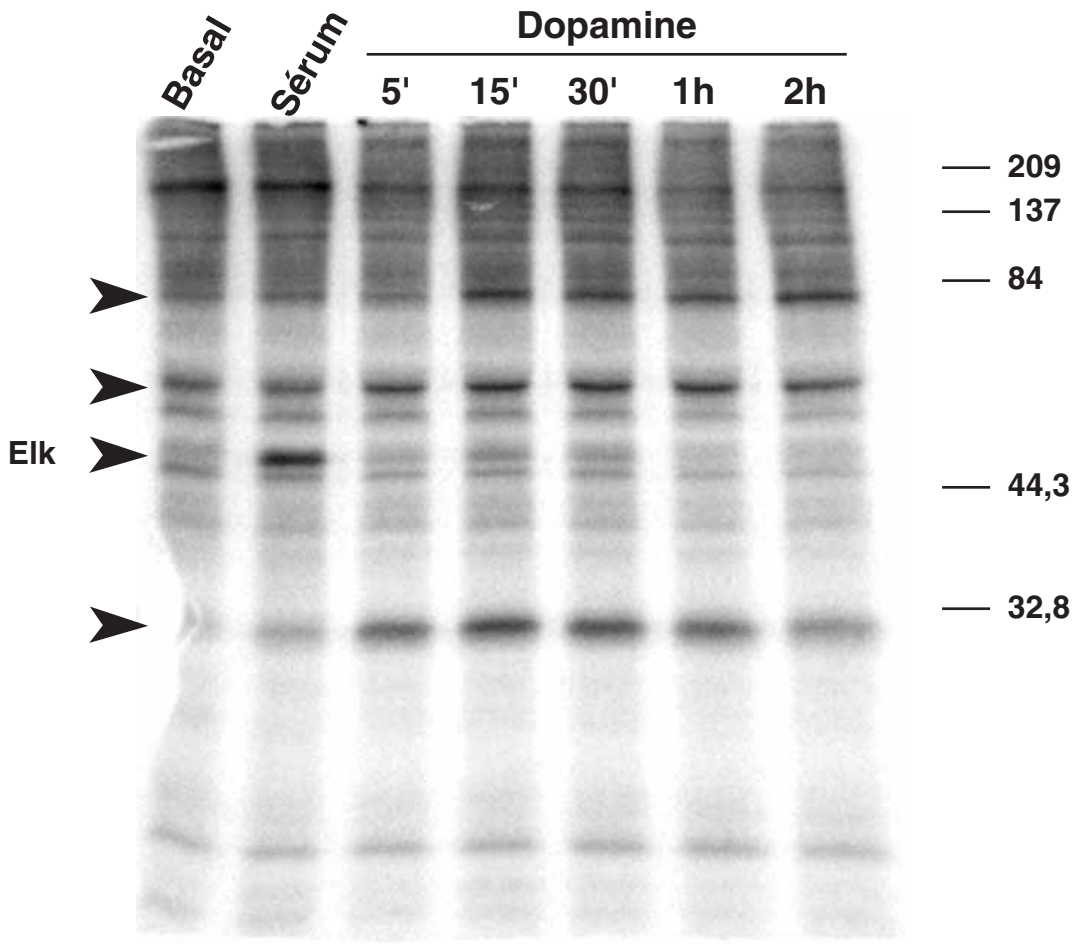


Figure 56 : Dosage de l'activité des MAPK (ERK1) dans les cellules COS-7 lors de la désensibilisation du récepteur D_{1C}.

La méthode de dosage est la même que pour la Figure 55. Le récepteur D_{1C} est traité à la dopamine (10 µM) de 5 minutes à 2 heures avant que les cellules soient lysées. Le niveau basal et un témoin positif (sérum) migrent conjointement. La bande correspondant au substrat in vitro de la MAPK (Elk) est indiquée avec trois autres bandes dont les intensités changent au cours du traitement.

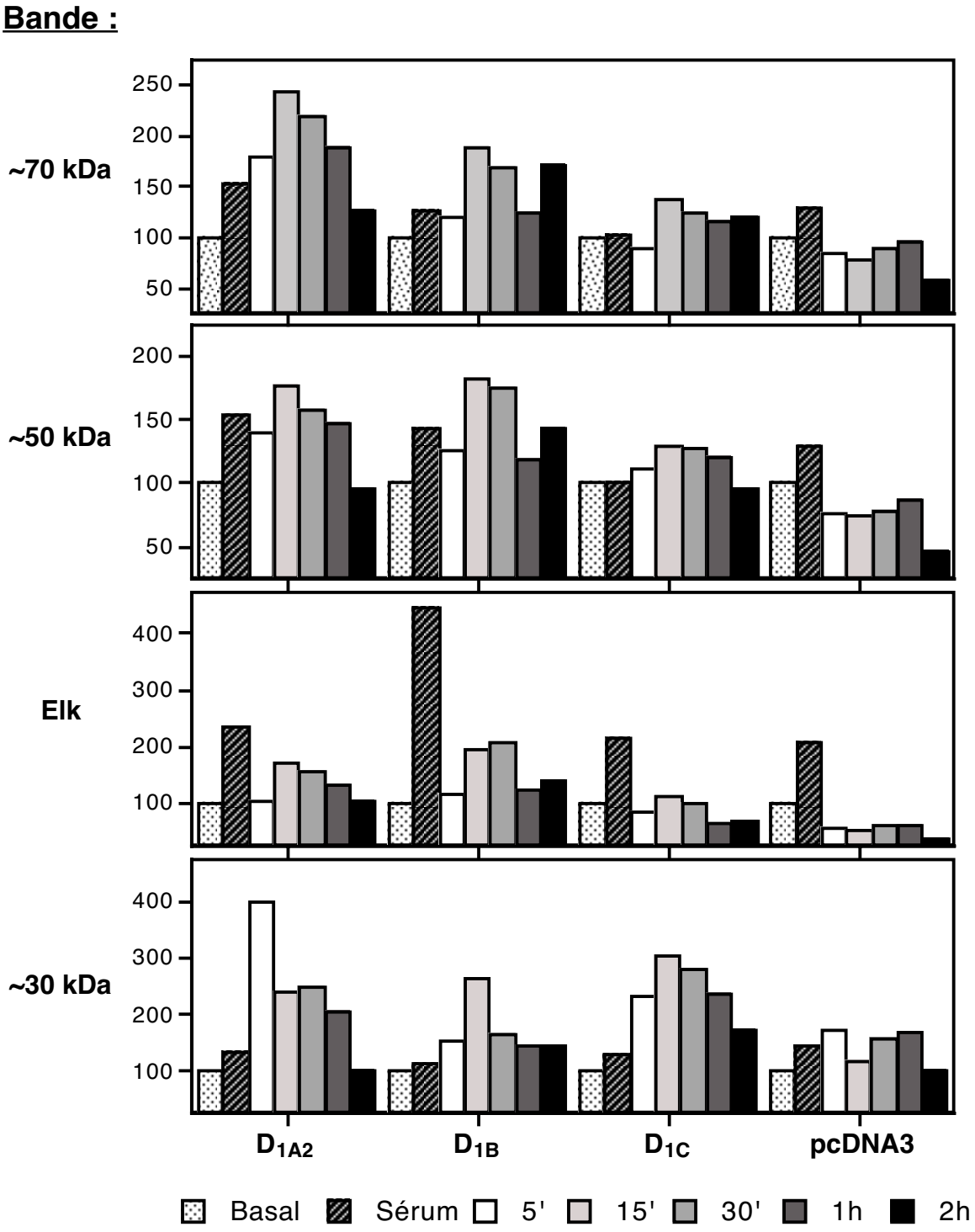


Figure 57 : Dosage de l'incorporation de phosphate radiomarqué après immunoprécipitation de la MAPK ERK1 étiquetée HA dans les cellules COS-7.

Quantification des bandes marquées sur le gel de la Figure 56, pour chaque sous-type du récepteur D_1 et pour le témoin COS-7 transfecté par le plasmide vide pcDNA3. Les quantifications sont normalisées par la quantité de protéines chargée sur le gel et par le dosage de l'activité de la ßgalactosidase représentative de l'efficacité de transfection. Enfin chaque groupe de valeurs est rapporté à la valeur basale non activée.

des sous-types du récepteur D_1. En effet, l'augmentation de l'incorporation de ^{32}P à 5 minutes devient maximale à 15 minutes pour retomber ensuite au niveau de base, mis à part pour le récepteur D_{1B}. L'amplitude de variation la plus forte est celle du récepteur D_{1A2}. Cette activité est bien spécifique de l'activation des récepteurs D_1 car on ne remarque aucune variation chez le témoin. Pour la bande intermédiaire, le profil est très similaire a celui décrit précédemment, mais on ne retrouve pas autant de différences d'amplitude entre les sous-types D_{1A2} et D_{1B}. A nouveau, la variation est spécifique puisque aucune différence n'est observée pour le témoin. Enfin, la bande la plus basse se retrouve activée de façon intense à 5 minutes pour les récepteurs D_{1B} et D_{1C} avec une baisse lente jusqu'au niveau basal. Le profil du récepteur D_{1A2} est caractérisé par une activation visible dès 5 minutes, et qui baisse fortement dès 15 minutes. Toutes ces observations sont toutefois à prendre avec précautions du fait que ces expériences n'ont pas été reproduites pour le moment. Mais, l'analyse comparée de chacune des bandes provient des mêmes échantillons pour chaque condition, ce qui offre un contrôle interne. De plus, toutes ces observations sont spécifiques de l'activation des récepteurs D_1 puisque l'on ne les retrouvent pas dans les cellules transfectées avec le plasmide vide pcDNA3. Pour finir, il semble que ces protéines ne coimmunoprécipitent pas avec la protéine ERK1 car on les retrouve même en l'absence de cotransfection de la protéine ERK1 étiquetée HA. Il semble donc que ces bandes soient reconnues par l'anticorps monoclonal anti-HA et qu'elles soient récupérées dans le culot d'immunoprécipitation.

Toutes ces observations sur les activations des voies MAPK restent pour le moment préliminaires. L'utilisation des lignées stables pour rationaliser les expériences et obtenir une meilleure reproductibilité reste encore à poursuivre pour confirmer les hypothèses présentées. Cependant, il semble que le récepteur D_{1C} soit capable d'activer un ensemble particulier de signaux cellulaires, différents de ceux qui sont mis en évidence pour les autres sous-types du récepteur D_1, ce qui confrime son rôle fonctionnel.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La définition de caractères fonctionnellement homologues capables de discriminer chacun des sous-types du récepteur D_1 est au centre du travail présenté dans ce manuscrit. Nous avons pu montrer, sans ambiguïté, qu'un petit nombre de paramètres fonctionnels, principalement la désensibilisation, pouvait définir chacun des sous-types du récepteur D_1. Au cours de ce travail, nous avons renconter un ensemble de difficultés qu'il a fallu essayer de résoudre ou de contourner. Nous avons ainsi mis en évidence une interaction inhibitrice entre les récepteurs D_1 et les récepteurs A_1 de l'adénosine qui est discutée dans la première partie de ce chapître. Par ailleurs, l'analyse fonctionnelle précise de chacun des sous-types du récepteur D_1 se devait d'être complétée par une étude morphologique des conséquences de la désensibilisation à l'échelon cellulaire. Cette approche, qui a nécessité le développement d'outils spécifiques, s'est avérée particulièrement ardue. Une partie de ce chapître est consacrée à la discussion de ce problème et de la manière par laquelle nous pourrions le surmonter.

I. Les interactions entre les voies de l'adénosine et de la dopamine

La totalité des données connues nous a conduit à penser que la présence d'adénosine pouvait nous empêcher de visualiser correctement la désensibilisation des récepteurs D_1 de la dopamine. En effet, le traitement chronique *in vivo* par des agonistes de l'adénosine, dans le cerveau du rat, entraîne une désensibilisation des récepteurs A_2 mais pas des récepteurs A_1, ainsi qu'une diminution de la stimulation maximale de l'adénylate cyclase induite par la dopamine (Porter *et al*., 1988). Cette baisse d'activité est spécifique des récepteurs D_1 et dépend de la stimulation des récepteurs A_1 puisque ce phénomène est reproduit par le R(-)-PIA, un agoniste spécifique des récepteurs A_1 (Abbracchio *et al*., 1987).

Il a été montré de façon préliminaire dans une lignée exprimant de manière constitutive les récepteurs D_{1A} (NS20Y) qu'il existe bien une interaction entre les récepteurs adénosine et dopamine. La désensibilisation par la dopamine des récepteurs D_{1A} présents dans ces cellules, n'entraîne pas de modification de la capacité d'activation des récepteurs de l'adénosine (Barton et Sibley, 1990). Toutefois, ces expériences n'analysent pas en détail les types de récepteurs de l'adénosine mis en jeu, ce qui ne permet pas de tirer de conclusions précises quant aux interactions observées dans ce type cellulaire.

Les interférences entre les récepteurs D_2 et les récepteurs de l'adénosine sont les caractéristiques les mieux étudiées. En effet, il a été montré que dans des neuroblastomes humains (SH-SY5Y) qui expriment les récepteurs adénosine A_{2A} et A_1 de façon constitutive,

l'activation des récepteurs A_1 par un agoniste spécifique, inhibe la transduction du signal des récepteurs D_2 transfectés (Salim *et al.*, 2000). Les résultats obtenus au laboratoire indiquent, comme pour nos expériences, que c'est la stimulation tonique de ses propres récepteurs qui inhibe la transduction du signal et qui entraîne une modulation du potentiel de dépolarisation. Cet effet est mimé par l'application de l'adénosine déaminase dans le milieu de culture ou par l'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs A_1. Dans les cellules GH4 (cellules tumorales de l'hypophyse) l'adénosine module également de façon autocrine l'activité des canaux calciques voltage-dépendants par l'intermédiaire des récepteurs A_1 (Zapata *et al.*, 1997).

En raison de ces observations nous avons donc employé un antagoniste des récepteurs A_1 de l'adénosine, qui nous a permis d'obtenir un profil de désensibilisation pour le récepteur D_{1A2} (Figure 34). Il semble d'ailleurs que ce sous-type soit plus affecté que le récepteur D_{1B} par cette interaction avec le récepteur de l'adénosine. Des analyses complémentaires nous ont indiqué que ce blocage de la désensibilisation des récepteurs D_1 ne dépend pas d'un élément contenu dans le sérum, mais plutôt de l'activation tonique provoquée par l'adénosine présente dans le milieu et sécrétée par la cellule elle-même, puisque l'adénosine déaminase est capable de rétablir l'activation et la désensibilisation normale du récepteur D_{1A2}.

Nous avons alors cherché à étudier ces interactions de façon plus précise. Les cellules Ltk- transfectées de façon stable et exprimant à des taux proches les récepteurs A_1 et D_{1A} humains nous ont permis de tester un ensemble de composés de manière plus systématique. L'activation des récepteurs par des agonistes D_1 (SKF-38393 et dopamine) ou A_1 (R-PIA) seule ne permet pas d'observer la diminution de la réponse de récepteurs de la dopamine caractéristique de la désensibilisation. En revanche, lorsque l'on prétraite les cellules conjointement avec un agoniste A_1 et D_1, on observe une diminution de l'accumulation d'AMPc au bout de 1 heure de traitement. Ces résultats semblent dépendre du composé utilisé puisque le traitement par du CPT à la place du R-PIA ne permet pas d'observer la désensibilisation induite par un agoniste D_1. En outre, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs A_1 révèle comme précédemment, la désensibilisation du récepteur D_1. Une explication probable de ces résultats est que la stimulation tonique des récepteurs A_1 par l'adénosine secrétée par la cellule mobilise une partie des éléments nécessaires à la désensibilisation des récepteurs D_{1A}. En présence d'un antagoniste A_1 on lève cette inhibition. Par contre, le traitement par certains agonistes, comme le R-PIA, est aussi capable de mimer cet effet des antagonistes. Une interprétation possible est que, la forte activation des récepteurs A_1 entraîne leur internalisation dans la cellule, permettant la libération d'une partie des composants nécessaires à la désensibilisation du récepteur D_{1A}.

Il apparaît donc très important de connaître le mieux possible les caractéristiques des cellules sur lesquelles on travaille pour éviter d'analyser des phénomènes non spécifiques. Grâce

à ces observations, nous avons pu comparer les profils de désensibilisation de chacun des sous-types du récepteur D_1.

II. Analyse comparée des profils biochimiques de la désensibilisation des sous-types du récepteur D_1 chez les vertébrés.

Dans ce travail, nous avons utilisé une combinaison de techniques biochimiques et morphologiques pour montrer que chacun des trois sous-types du récepteur D_1 présente des propriétés particulières. Les profils de désensibilisation obtenus pour les récepteurs D_1 d'anguille nous donnent l'opportunité de les comparer avec ceux qui ont été obtenus pour les mêmes sous-types dans d'autres espèces de vertébrés. Jusqu'à présent, les analyses de la désensibilisation des récepteurs D_1 avait été réalisées uniquement chez les mammifères. Dans une lignée cellulaire dérivée d'un astrocytome humain (D384) et exprimant un récepteur de type D_{1A}, la désensibilisation de ce récepteur apparaît plus lente que pour le récepteur $ß_2$-adrénergique (Balmforth *et al.*, 1990), mais avec une amplitude similaire. D'autres études effectuées dans des cultures primaires de striatum de souris montrent que la désensibilisation homologue des récepteurs D_1 de la dopamine se manifeste après 15 minutes et qu'elle est réversible jusqu'à 1 heure (Chneiweiss *et al.*, 1990). La réduction maximale de l'activité de l'adénylate cyclase (50%) n'est atteinte qu'après 18 heures de traitement. En outre, lors des 15 premières minutes de traitement par un agoniste des récepteurs dopaminergiques, on constate également une désensibilisation des récepteurs ß-adrénergiques et sérotoninergiques (5HT), qui n'est plus visible lors du traitement de 18 heures. Cette observation met en évidence l'existence d'une désensibilisation “hétérologue”, qui affecte la régulation globale des voies de signalisation de la cellule. Ces premières expériences révèlent la difficulté d'examiner de façon comparée et précise toutes les données que nous avons accumulées par la suite. La multiplicité des systèmes employés et des méthodes d'analyse rendent aussi les comparaisons entre études très difficiles.

II.A. Diversité des systèmes et des méthodes d'étude

Pour essayer de résumer les données de la littérature, il faut prendre en compte le fait que plusieurs méthodes différentes ont été employées pour analyser la désensibilisation des récepteurs. Tout d'abord, des techniques biochimiques ont été employées pour mesurer les modifications des voies de signalisation par le dosage de l'AMPc ou par la mesure de l'activité de l'adénylate cyclase. De même des outils pharmacologiques facilitant l'étude du nombre de

récepteurs capables de lier de façon spécifique des ligands marqués ont été utilisés. Ces démarches permettent en théorie d'analyser la diminution du nombre de récepteurs accessibles à la surface de la cellule. Toutefois, ces techniques présentent de nombreuses limites. La récupération des membranes cellulaires pour le dosage de la liaison à l'équilibre des récepteurs est une étape critique. Il faut éviter de mélanger les récepteurs présents à la membrane plasmique avec ceux qui sont présents dans des vésicules d'endocytose ou dans d'autres compartiments intracellulaires. Comme peu d'expériences de fractionnement subcellulaire ont été effectuées afin de séparer clairement les différents compartiments, ces méthodes d'analyses pharmacologiques ne reflètent pas de façon claire, les variations du nombre de récepteurs accessibles au ligand. Ces méthodes sont intermédiaires entre les analyses biochimiques pures et les outils morphologiques qui permettent de visualiser les récepteurs, tels que des anticorps dirigés directement contre les récepteurs ou différentes “étiquettes” ajoutées à leur séquence. Il faut combiner à ces outils, la grande diversité des modèles cellulaires employés. Les premières études utilisaient des extraits membranaires de régions riches en récepteurs D_1 (striatum), ou des lignées cellulaires tumorales ayant certaines propriétés de cellules dopaminergiques (D384, NS20Y). Le manque de caractérisation des sous-types du récepteur D_1 exprimés rendent imprécises les données obtenues. Grâce au clonage des différents sous-types du récepteur D_1, il est devenu possible de les exprimer de façon transitoire ou stable dans des systèmes hétérologues (COS-7, HEK 293,…) ou dans des cellules plus proches des neurones. L'importante diversité des modèles et des techniques rendait nécessaire de comparer dans une structure définie et de façon reproductible chacun des sous-types du récepteur D_1.

II.B. Le récepteur D_{1A}, le représentant ancestral des récepteurs de la dopamine

Les expériences de désensibilisation faites sur le récepteur D_{1A} humain exprimé de façon constitutive dans une lignée neuronale dérivée d'un neuroblastome de souris (NS20Y) montrent des résultats similaires aux nôtres (Barton et Sibley, 1990). Les auteurs ont observé une forte diminution de l'accumulation de l'AMPc dès les premières 5 minutes. La diminution atteint 80% de la stimulation maximale après 90 minutes de traitement avec un agoniste, ce qui est beaucoup plus rapide que nos observations, car nous n'obtenons cette même diminution qu'après 6 heures, dans nos conditions expérimentales. Toutefois, l'utilisation d'une concentration d'agoniste dix fois supérieure aux nôtres dans ces expériences, est probablement la raison de cette différence. Des profils de désensibilisation similaires ont été trouvés dans des cellules adrénocorticales de souris dans lesquelles les récepteurs D_{1A} humains (après transfection) désensibilisent en présence de dopamine 10 μM. L'activité de l'adénylate cyclase diminue de 40% après 30 minutes de

traitement avec un rebond jusqu'à 1 heure, comme ce que nous avons constaté pour le profil du récepteur D_{1A2} d'anguille (Olson et Schimmer, 1992). Ce rebond a été observé aussi pour le récepteur D_{1A} de singe dans les cellules C6 de gliome de rat (Lewis *et al.*, 1998). Un processus rapide de désensibilisation apparaît, dans cette lignée cellulaire, dès les 15 premières minutes avec un plateau assez court jusqu'à 30 minutes et une autre diminution après 2 heures qui atteint 20% de l'accumulation maximale d'AMPc. Les expériences effectuées après expression transitoire dans des cellules hétérologues d'insectes Sf9 montrent également une réduction de 40% de la stimulation maximale de l'adénylate cyclase (Ng *et al.*, 1995). Dans la mesure où nous obtenons des résultats largement comparables dans les cellules COS-7, il nous semble que ce système est donc approprié à l'étude de la désensibilisation des récepteurs D_1, probablement en raison de la conservation très forte des molécules impliquées dans la transduction des signaux (Yokoyama et Starmer, 1992).

Nos résultats chez les poissons confirment les observations faites chez les mammifères. Le récepteur D_{1A2} se désensibilise en deux phases. Ce processus est probablement une caractéristique très conservée chez les vertébrés. Le récepteur D_{1A} est en effet reconnu comme tel, sur la base des comparaisons de séquences, même chez les crâniates les plus primitifs comme les myxines. Bien que l'on ne dispose pas encore d'informations sur les propriétés des récepteurs D_{1A} des agnathes, la conservation des caractéristiques fondamentales du sous-type D_{1A} entre les poissons et les mammifères, suggère que l'acquisition de ces propriétés est devenue une contrainte fonctionnelle majeure. On peut donc définir ces caractères comme “homologues”, hérité de l'ancêtre des récepteurs D_{1A}, et représentant la meilleure définition possible du sous-type D_{1A} de récepteur dopaminergique chez les vertébrés.

Selon de nombreux auteurs, la première étape de la désensibilisation correspond au découplage du récepteur des protéines G (Hausdorff *et al.*, 1990). Cette étape nécessite la phosphorylation de la région C-terminale du récepteur par des kinases non spécifiques comme la PKA, ou spécifiques comme les GRK. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le récepteur D_{1A} humain est phosphorylé de façon importante dès les 5 premières minutes de traitement par un agoniste (Tiberi *et al.*, 1996). Après cette étape de phosphorylation, l'affinité du récepteur pour les protéines G baisse sensiblement. La fixation d'autres protéines spécifiques des récepteurs, comme l'arrestine, empêche toute nouvelle interaction de la protéine G en créant un véritable encombrement stérique. Par la suite, la deuxième étape de baisse d'accumulation d'AMPc pourrait être représentative d'un autre mécanisme spécifique de la désensibilisation : l'internalisation. Ce phénomène a déjà été décrit comme étant séparé dans le temps et dans l'espace du découplage fonctionnel (Ng *et al.*, 1995). Par ce processus, le récepteur ne peut plus

être rejoint par l'agoniste et l'activité globale de la réserve de récepteurs diminue dans toute la cellule.

Nos observations complémentaires utilisant le H-89, un inhibiteur de la PKA, laisse penser que la voie de désensibilisation dépendante de la PKA joue en fait un rôle plus important qu'on ne le suppose actuellement. De nombreux travaux ont souligné que la désensibilisation dépendait majoritairement de la phosphorylation des récepteurs par les GRK, et que la fixation des arrestines permettait l'association à la clathrine puis l'internalisation du complexe. La faible quantité de GRK et d'arrestines dans les cellules COS-7 pourrait révéler l'importance de la désensibilisation dépendante de la PKA. Peu d'observations ont été effectuées pour discuter cette alternative, même si certains travaux ont corrélé l'intervention de cette voie, à la présence d'une faible concentration d'agoniste (Hausdorff *et al.*, 1989). Dans ce travail, les auteurs indiquent qu'à de faibles concentrations (nanomolaires) d'agoniste, seule la phosphorylation par la PKA du récepteur est visible alors qu'à de plus fortes concentrations (micromolaire) on constate une double phosphorylation par la PKA et les GRK. La désensibilisation dépendante de la PKA pourrait en fait intervenir comme un phénomène initial avant que les GRK et arrestines ne prennent le relais pour amplifier le phénomène. Toutes ces variations seraient modulées par la quantité d'agoniste présent. Ces interprétations sont sujettes à controverse car d'autres auteurs montrent au contraire qu'il n'y a que peu d'interventions des voies PKA sur la désensibilisation des récepteurs (Lewis *et al.*, 1998) lorsqu'ils emploient d'autres inhibiteurs de la PKA. Si l'existence de deux mécanismes lors de la désensibilisation : découplage et internalisation, est maintenant bien établie, la part relative de chacun et la compréhension de leurs mécanismes restent encore à préciser.

II.C. Le récepteur D_{1B}, un récepteur à activité constitutive intrinsèque

En comparant les observations effectuées pour les récepteurs D_{1B}/D_5 (Tiberi et Caron, 1994) ou pour des mutants du récepteur $ß_2$-adrénergique (Pei *et al.*, 1994a), on remarque que tous ces sous-types ont une activité intrinsèque élevée. L'accumulation basale d'AMPc du récepteur D_{1B} d'anguille est deux fois plus élevée que celle du récepteur D_{1A2} (Cardinaud *et al.*, 1997). Nous n'avons pas vu de différences dans les profils d'activation des récepteurs D_{1B} (Figure 42) qui puissent nous indiquer la présence de cette activité constitutive, probablement à cause de nos techniques de dosage de l'AMPc qui ne permettent pas des mesures précises pour les taux bas d'accumulation d'AMPc. Toutefois, lorsque l'on compare le profil de désensibilisation du récepteur D_{1B} avec celui du récepteur D_{1A2}, on note que le niveau maximal d'accumulation du récepteur D_{1B} est plus bas que celui du récepteur D_{1A2}. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que

l'activité constitutive du récepteur D_{1B} entraîne un état constitutivement désensibilisé du récepteur et qu'en contrepartie, l'activation du récepteur ne puisse pas atteindre celle du récepteur D_{1A2}. Cet état constitutivement désensibilisé, a été observé pour le mutant activateur du récepteur $ß_2$-adrénergique dont la phosphorylation par GRK2 et GRK3 est augmentée, ce qui accroît son état désensibilisé (Pei *et al.*, 1994a). Dans ces conditions, le récepteur est moins capable de moduler l'amplitude de ces réponses en présence d'un agoniste.

Une étude de désensibilisation comparée a été publiée pour les récepteurs D_{1A} et D_{1B} humain exprimés dans des cellules Ltk- (Jarvie *et al.*, 1993). Les résultats obtenus montrent en premier lieu une stimulation des taux d'AMPc deux fois plus forte pour le récepteur D_{1A} que pour le récepteur D_{1B} pour le même agoniste. Après 15 minutes d'exposition à la dopamine (10 μM) l'activité de l'adénylate cyclase diminue de 21% pour le D_{1A} contre 37% pour le D_{1B} et après 1 heure, elle tombe à 28% pour le D_{1A} contre 38% pour le D_{1B}. Si la diminution n'est pas aussi forte que dans nos propres expériences, la différence entre les profils des récepteurs D_{1A} et D_{1B} est identique. On peut donc affirmer que l'activité constitutive du récepteur D_{1B} et le profil de désensibilisation qui l'accompagne est une caractéristique conservée au cours de l'évolution des vertébrés. Donc, comme pour le récepteur D_{1A}, on peut définir des caractéristiques homologues discriminantes pour le sous-type D_{1B}. Il est vraisemblable que ces propriétés ont été acquises peu de temps après la duplication de l'ancêtre des récepteurs D_{1A} et D_{1B}.

II.D. Le récepteur D_{1C}, un récepteur insensible ou inutile

En ce qui concerne le récepteur D_{1C}, la désensibilisation représente la première propriété clairement discriminante décrite pour ce sous-type. Le profil de désensibilisation du récepteur D_{1C} est compatible avec les dosages d'AMPc à l'état basal (Cardinaud *et al.*, 1997; Sugamori *et al.*, 1994). Dans ces mesures, le niveau basal d'AMPc est juste un peu plus élevé que celui du récepteur D_{1A2}, il est donc logique, comme pour le récepteur D_{1B} que l'accumulation maximale du récepteur D_{1C} soit plus faible que celle du D_{1A2}.

Mais la caractéristique la plus intéressante est cette absence de désensibilisation du récepteur. Cette propriété n'est visiblement pas due à une localisation incorrecte du récepteur, puisque nous l'observons clairement à la membrane plasmique (Figure 44), et nous n'avons observé aucune rétention particulière du récepteur dans un compartiment intracellulaire. De plus, les profils pharmacologiques et d'activité du récepteur ne donnent pas d'indice d'un quelconque problème fonctionnel. En utilisant les chimères faites chez le xénope, on remarque que la désensibilisation de la chimère $D_{1C}/D_{1A\text{-}Cter}$ n'intervient qu'après 30 minutes. Cette observation pourrait ne correspondre qu'à l'internalisation qui est connue pour survenir plus tard dans la

désensibilisation et ne pas impliquer les mécanismes de découplage. Mais, il est possible aussi que l'absence d'un élément structural du récepteur important pour la désensibilisation rapide, ralentisse la phosphorylation et ainsi la vitesse de désensibilisation. Un phénomène de ce type a été observé dans des lignées cellulaires CHO contenant différents niveaux de PKA (Sibley *et al.*, 1998). Ainsi dans les lignées contenant le moins de PKA, la désensibilisation du récepteur D_{1A} n'intervient que lentement et s'accèlere si on augmente la quantité de PKA. Ce phénomène est reproduit si l'on mute des sites de phosphorylation par la PKA sur le récepteur D_{1A} (Thr 135, Ser 229, Thr 268, Ser 380). Il est donc envisageable que dans ces chimères tout les sites nécessaires à la phosphorylation ne soient pas présents. Si une grande partie des phénomènes de désensibilisation est donc imputée à la séquence de la région C-terminale, ces observations sont sujettes à controverse. La découverte d'un récepteur D_1 chez le poisson rouge, amputé de 80 acides aminés dans sa région C-terminale, montre que les caractéristiques principales de ce récepteur n'en sont pas modifiées (Frail *et al.*, 1993). Aussi bien sa liaison aux ligands, sa capacité à accumuler l'AMPc que son profil de désensibilisation ne sont pas changés dans ce variant par rapport au récepteur humain sauvage, même si les expériences de désensibilisation n'ont pas été très détaillées.

Dans le cas des récepteurs ß-adrénergiques, quelques travaux ont suggéré que les sous-types de récepteur $ß_1$, $ß_2$ et $ß_3$ humains pouvaient être distingués sur la base de leurs propriétés de désensibilisation. Transfectés dans le même type cellulaire, les réponses à l'activation du récepteur $ß_2$ disparaissent plus vite et de façon plus intense que celles du récepteur $ß_1$, le récepteur $ß_3$ restant peu affecté par la désensibilisation (Nantel *et al.*, 1993). Le traitement à l'isoprotérenol 10 μM pendant 30 minutes entraîne, pour le récepteur $ß_2$-adrénergique, une réduction de l'activité de l'adénylate cyclase avec une séquestration intracellulaire d'environ 30% de la quantité de récepteurs présents à la surface. Au contraire, après transfection du récepteur $ß_3$-adrénergique dans des cellules fibroblastiques, un traitement identique n'entraîne aucune désensibilisation. Toutefois, ces analyses n'ont pas dépassé 1 heure de traitement et n'ont pas été obtenues dans d'autres types cellulaires que les fibroblastes. Dans notre travail, nous avons montré que le récepteur D_{1C} ne se désensibilise pas à court terme, comme le récepteur $ß_3$, mais pas non plus à long terme après 1 heure de traitement et jusqu'à 12 heures en présence d'apomorphine 10 μM. Dans le cas du récepteur $ß_3$-adrénergique, ces propriétés fonctionnelles sont bien corrélées avec le nombre et le type de motifs de séquences modifiés par phosphorylation (Marullo *et al.*, 1995). En effet, à l'extrémité C-terminale du récepteur $ß_3$, on ne retrouve aucun des sites de phosphorylation qui sont présents pour les récepteurs $ß_1$ ou $ß_2$. Mais, ce n'est pas le cas du récepteur D_{1C}, pour lequel l'alignement de la région C-terminale ne montre pas de telles modifications. En conséquence, on peut suggérer que l'absence de désensibilisation

observée pour les sous-types $ß_3$-adrénergique et D_{1C} dopaminergique ne proviennent pas des mêmes mécanismes.

L'échange de la région C-terminale chez les récepteurs de xénope confirme cependant le rôle important de cette région dans l'établissement de la désensibilisation. Même si, l'ajout de l'extrémité C-terminale du récepteur D_{1A} à la séquence du récepteur D_{1C} ne permet pas de retrouver l'intégralité du profil de désensibilisation du récepteur D_{1A}, ce qui indique que la région C-terminale n'est très certainement pas la seule à intervenir dans ce mécanisme.

La reproduction de ces profils de désensibilisation dans des cellules dérivées de neurones de la muqueuse olfactive du rat (13.S.1.24) montre que ces observations ne sont pas uniquement spécifiques des types cellulaires fibroblastiques comme les cellules COS-7. Les différents profils de désensibilisation doivent donc être dus à des variations dans les interactions avec les protéines partenaires de la désensibilisation. Ainsi, le récepteur D_{1A} du rat active plus faiblement l'adénylate cyclase quand il est coexprimé avec la protéine kinase GRK5, que quand il est coexprimé avec GRK2 ou GRK3 (Tiberi *et al.*, 1996). Le contenu des neurones en protéines impliquées dans le processus de désensibilisation pourrait donc aussi expliquer la différence de désensibilisation observée pour le récepteur D_{1C}. De telles modifications changent les interactions entre le récepteur et ses partenaires et modifient aussi son profil de désensibilisation.

Si le récepteur D_{1C} n'est pas capable de se désensibiliser correctement, que ses régions d'expression sont réduites au cervelet et à l'hypothalamus et qu'il est absent chez les mammifères, à quoi sert-il ? Plusieurs hypothèses sont envisageables. La première est que le récepteur D_{1C} soit un vestige d'un récepteur ancestral dont la fonction est en train de disparaître et qui n'est déjà effectivement plus détectable chez les mammifères. Cependant, la forte conservation de sa structure chez un grand nombre d'espèces actuelles, la conservation de ses profils pharmacologiques, d'activation de l'adénylate cyclase et de stimulation des voies MAPK, font qu'il apparaît peu probable qu'il soit en train d'accumuler des mutations pour se transformer en pseudogène. Une autre hypothèse est que ce récepteur ait une fonction particulière, non encore découverte, uniquement utilisée chez certaines espèces, et absente chez les mammifères. Le caractère restreint de la région d'expression du transcrit chez l'anguille (Kapsimali *et al.*, 2000) est en faveur de cette hypothèse.

Enfin, il est envisageable qu'en fait, la majorité des modifications évolutives ne se situe pas dans la région codante mais dans la région régulatrice non codante. En effet, si l'on compare souvent les récepteurs D_1 dopaminergiques et $ß_2$-adrénergiques pour le nombre important de ressemblances dans la région codante, il faut remarquer qu'en fait ces similitudes s'arrêtent là. En effet, dans les régions non codantes, les promoteurs des gènes des récepteurs $ß_2$-adrénergiques

possèdent des séquences consensus TATA et CAAT alors que les promoteurs des gènes codant pour les récepteurs D_1 en sont dépourvus.

III. Analyse morphologique de la localisation cellulaire des sous-types du récepteur D_1

III.A. La complexité des méthodes d'analyses employées

Une grande partie de nos expériences ont été faites pour comprendre comment la désensibilisation fonctionnelle pouvait être corrélée avec des changements du nombre des récepteurs à la surface de la cellule. Une bonne partie de ces études a analysé les variations de valeurs de Bmax après liaison à l'équilibre des récepteurs pour apprécier les modifications du nombre de récepteurs à la surface de la cellule. Ainsi, alors que la diminution de la liaison du ^{3}H-SCH-23390 est lente après celle de l'activité de l'adénylate cyclase, et n'atteint son maximum qu'après 3 heures pour le récepteur D_{1A} (Barton et Sibley, 1990), la perte maximale de liaison des récepteurs n'est que de 65 à 70%, toujours inférieure à la baisse d'activité totale de l'adénylate cyclase (environ 80%). De plus, les valeurs de liaison ne sont pas corrélées avec celles de l'accumulation d'AMPc obtenues dans les lignées C6 de gliome de rat transfectées par le récepteur D_{1A} selon les agonistes utilisés (Lewis *et al.*, 1998). Tous ces éléments rendent compte de la difficulté de quantifier la part des récepteurs internalisés. En outre, comme nous l'avons déjà discuté, il est plutôt difficile d'accorder une importante fiabilité à ce type de mesure. En effet, les dosages de liaison à l'équilibre des récepteurs n'étant pour la plupart pas réalisés après fractionnement subcellulaire et séparation de la fraction contenant la membrane plasmique du reste des compartiments de la cellule, il est probable qu'en réalité, on ne dose pas vraiment le nombre de récepteurs qui restent en surface mais plutôt le nombre total de récepteurs capables de lier le ligand.

Des études plus spécifiques ont été effectuées pour le récepteur D_{1A} humain. Le fractionnement cellulaire montre qu'après 1 heure de traitement, seulement 28% des récepteurs de la surface cellulaire sont internalisés dans la fraction vésiculaire légère (Ng *et al.*, 1995). Des observations immunocytochimiques présentent également une légère baisse dans le marquage à la surface de la cellule en microscopie confocale, en partie parce que les cellules SF9 d'insectes utilisées pour cette étude sont très arrondies, avec peu de cytoplasme. Par ailleurs, dans des études antérieures, le même groupe a démontré, en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette c-myc ajoutée au récepteur, qu'en plus de cette baisse du marquage à la membrane plasmique,

des agrégats de récepteurs sont observés à la surface de la cellule (Ng *et al.*, 1994). D'autres travaux sur l'internalisation des récepteurs de la dopamine ont été faits en utilisant des anticorps spécifiques, contre le récepteur D_{1A} du rat par exemple. Ce récepteur transfecté dans les cellules CHO voit son marquage disparaître de façon considérable après 15 minutes d'exposition à 50 μM de dopamine (Ariano *et al.*, 1997a). Ces observations sont d'ailleurs reproduites dans des cultures primaires ou des tranches de striatum de cerveau du rat. Un phénomène d'internalisation est observé, par le suivi du marquage du FM1-43 dans les compartiments intracellulaires, en même temps que cette perte du marquage des récepteurs D_{1A}. Malgré tout, la disparition du marquage est très forte et rapide, et pas véritablement compatible avec les cinétiques de dégradations connues ni avec les différentes données de la désensibilisation déjà obtenues pour ce type de récepteurs. Il semble plus réaliste de penser, qu'en fait, dans ces expériences, l'association de protéines avec la partie intracellulaire du récepteur est capable de masquer l'accès de l'épitope et d'empêcher ainsi le marquage des récepteurs en cours de désensibilisation. En microscopie électronique, une autre étude sur le récepteur D_{1A} dans le striatum du rat a décrit un processus d'internalisation 4 minutes après l'injection d'un agoniste et la présence du récepteur dans des vésicules d'endocytose mais, ni dans l'appareil de Golgi, ni dans le réticulum endoplasmique ou les lysosomes (Dumartin *et al.*, 1998). L'observation du trafic cellulaire des récepteurs D_1 est donc assez complexe, et nécessite de bien définir l'environnement d'étude dans lequel on se place.

III.B. Mise au point d'anticorps à large spectre de reconnaissance

Dans un premier temps, nous avons tenté de développer des anticorps pour localiser dans les tissus et les cellules, les différents sous-types du récepteur D_1. Les récepteurs du xénope avaient été choisis afin d'obtenir des anticorps capables de reconnaître les sous-types dans le plus large éventail d'espèces. Les séquences du xénope étant aussi proches de celles des mammifères que de celles des poissons, elles nous étaient apparues comme un choix raisonable. Même si les observations faites avec l'anticorps anti-D_{1B} ont donné quelques résultats intéressants, globalement les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. La spécificité des anticorps n'est pas bonne au vu des réactions croisées entre les sous-types mis en évidence par western blot, même si l'anti-D_{1C} paraît le plus spécifique. De plus après purification des anticorps sur des colonnes d'affinité, nous n'avons pas obtenu d'amélioration suffisamment nette. Il est donc probable, que de meilleurs résultats soient obtenus avec des anticorps monospécifiques dirigés contre un sous-type particulier dans une région peptidique délimitée et distincte, et surtout réalisés chez l'espèce où l'on veut obtenir les observations anatomiques.

Malgré tout, les marquages des cellules effectuées avec le récepteur D_{1B}, nous ont révélé que dans un système de transfection transitoire, on masque toujours, en partie l'augmentation du marquage intracellulaire par le marquage élevé de la voie de sécrétion. Ceci peut expliquer pourquoi, dans nos expériences, nous n'avons pas pu voir clairement une baisse dans le marquage à la membrane plasmique du récepteur D_{1B} après traitement à la dopamine. Cependant, nous n'avons pas non plus aperçu d'agrégats de récepteurs D_{1B} à la surface membranaire (Figure 39).

III.C. Les protéines de fusion entre les sous-types du récepteur D_1 et la GFP

L'utilisation de la protéine GFP nous est donc apparue comme une bonne solution pour d'une part pouvoir suivre les récepteurs de façon dynamique et *in vivo*, et d'autre part éviter les problèmes de reconnaissance ou de spécificité des anticorps. De nombreux récepteurs ont déjà été fusionnés à la GFP dans leur C-terminale, c'est le cas du récepteur $ß_2$-adrénergique (Barak *et al.*, 1997b), α_{1B}-adrénergique (Awaji *et al.*, 1998), de l'endothéline (Abe *et al.*, 2000), de la cholecystokinine (Tarasova *et al.*, 1997), du facteur de libération de la gastrine (Slice *et al.*, 1998) et du facteur de libération de la thyréotropine (Drmota *et al.*, 1998). Même si toutes ces expériences ont montré que l'ajout de la GFP ne semblait pas modifier les propriétés de ces récepteurs, il était important de “valider” nos constructions. Les comparaisons des profils pharmacologiques et biochimiques (Figure 40 et Figure 42) nous ont confirmé que les récepteurs D_1-GFP se comportaient de la même façon que les récepteurs sauvages. De plus, leur localisation est clairement membranaire et leur profil de désensibilisation identique à celui des récepteurs sauvages. Pourtant, aucune des observations cellulaires que nous avons faites, ne nous a permis de voir l'internalisation de ces récepteurs, ni même leur regroupement à la surface membranaire, considérée comme une étape préalable à l'endocytose. Par comparaison pour le récepteur $ß_2$-adrénergique couplé à la protéine GFP en C-terminal, on observe une internalisation identique à celle du récepteur natif après 15 minutes de stimulation par un agoniste. Dans le cas du récepteur de la cholecystokinine, l'ajout de la GFP à l'extrémité C-terminale du récepteur a permis de suivre son internalisation dans différents types cellulaires (Tarasova *et al.*, 1997). Pour ces récepteurs, l'endocytose est dépendante du ligand dans les types cellulaires HeLa, COS-1 et CHO, alors qu'elle semble constitutive dans les cellules NIH 3T3. En moyenne, les récepteurs de la cholecystokinine sont présents dans les endosomes dès 25 minutes et sont recyclés à la membrane dans l'heure qui suit. Nous avons testé plusieurs types cellulaires différents afin de vérifier s'il manquait certains éléments de la machinerie d'internalisation dans les cellules COS-7. Pourtant, que ce soit pour les cellules HEK 293, ou les constructions ont été exprimées

de façon stable, où pour les cellules 13.S.1.24 dérivées de neurones de la muqueuse olfactive, nous n'avons pas non plus observé d'internalisation des récepteurs D_1 malgré des profils de désensibilisation biochimique identique. Cette absence d'internalisation ne dépends donc pas du type cellulaire où sont exprimés les récepteurs. La diminution du marquage de la voie de sécrétion dans les lignées stables exclut la possibilité que l'internalisation soit masquée par la forte expression transitoire des récepteurs comme dans les cellules COS-7. Il apparaît donc que l'internalisation ne joue pas un rôle aussi important dans la désensibilisation des récepteurs D_1 de la dopamine. Des observations faites par l'équipe de von Zastrow (Vickery et von Zastrow, 1999) ont pourtant montré qu'il y avait une internalisation des récepteurs D_1 dans les cellules HEK 293 dépendante de la clathrine qui pouvait atteindre 80% des récepteurs marqués à la surface de la cellule. Les expériences effectuées sont assez différentes des nôtres. En effet, ils utilisent un anticorps dirigé contre une étiquette à l'extrémité N-terminale du récepteur et ne marquent que les récepteurs à la surface de la cellule. Il est alors possible d'imaginer que dans leurs expériences, les marquages observés ne soient pas représentatifs de la totalité des récepteurs de la cellule par le masquage de l'épitope dans certains replis de la membrane (caveolae) ou que le clivage d'une partie de la biotine soit protégée par la conformation du récepteur.

D'autres observations ont montré qu'en fonction des agonistes utilisés pour traiter les cellules, les résultats fonctionnels pouvaient être différents. Pour le récepteur δ-opioïde, la stimulation par l'étorpine entraîne la phosphorylation du récepteur et le recrutement de la ß-arrestine alors que l'action de la morphine ne permet que l'activation du récepteur et pas son internalisation (Zhang *et al.*, 1999). Afin de tester ce type d'hypothèse, nous avons fait réagir plusieurs composés pour activer le récepteur D_{1A2}-GFP (Figure 48). Aucun n'a permis d'observer l'internalisation des récepteurs, et il ne semble donc pas envisageable que l'absence d'internalisation soit due à l'utilisation d'un agoniste inapproprié.

Si des conclusions doivent ressortir de ces observations cellulaires, c'est d'abord qu'il n'existe pas de corrélation directe entre les événements biochimiques de la transduction du signal et une localisation spécifique des récepteurs dans des compartiments subcellulaires. Cette notion de séparation des deux phénomènes a été déjà abordée pour beaucoup de récepteurs par l'utilisation de produits bloquant l'endocytose des récepteurs par les voies de la clathrine (hyperosmolarité, concanavaline, déplétion en potassium). Peu d'études ont analysé en détail ces phénomènes, alors que les modèles de la désensibilisation établis par les groupes de Marc CARON et Robert LEFKOWITZ semblent privilégier un mécanisme séquentiel faisant intervenir le découplage des récepteurs puis l'internalisation. Dans le cas du récepteur α_{1B}-adrénergique, ce découplage est même imputé à la tyrosine 348 qui fait partie d'un motif NPXXY présent chez de nombreux récepteurs couplés aux protéines G dans le septième segment transmembranaire (Wang *et al.*, 1997a). La mutation de cette tyrosine en alanine, entraîne une

perte de l'activation des voies de signalisation, sans disparition de la liaison spécifique ni de la séquestration des récepteurs. Toutefois, aucune endocytose réelle n'est constatée par fractionnement subcellulaire ou par visualisation directe en immunofluorescence. L'absence d'endocytose après traitement par un agoniste a aussi été observée pour le sous-type de récepteur AT_2 de l'angiotensine II (Hein *et al.*, 1997). Aucune agrégation de récepteurs à la surface ni d'internalisation dans les cellules HEK 293 ne sont remarquées, alors que le récepteur AT_1 peut-être endocyté d'une manière proche de celle du récepteur $ß_2$-adrénergique. Aucune analyse biochimique n'a été effectuée pour voir si le récepteur AT_2 est tout de même capable de désensibiliser après exposition prolongée aux agonistes. En fait, l'absence d'internalisation des constructions D_1-GFP apporte un élément intéressant sur le fonctionnement du découplage fonctionnel des récepteurs. En effet, s'ils sont incapables de s'internaliser, mais que leur profil d'accumulation de l'AMPc au cours du temps n'est pas modifié par rapport au sauvage, il est possible que ce profil ne rende compte en fait que du découplage fonctionnel et non pas des deux phases de la désensibilisation. Ainsi la phosphorylation du récepteur par différentes kinases serait la seule raison d'une désensibilisation biphasique. Dans ce cas, l'internalisation ne jouerait pas un rôle dans la désensibilisation des récepteurs mais peut-être à plus long terme pour le contrôle de la densité des récepteurs à travers par exemple des phénomènes de resensibilisation.

IV. La nécessité des analyses in vivo

L'analyse *in vivo* de l'internalisation des récepteurs n'est pas effectuée de façon courante dans les laboratoires. Le groupe de Bertrand BLOCH a employé ce type d'analyse pour différentes classes de récepteurs. Ainsi, les récepteurs M_2 muscariniques de l'acétylcholine sont localisés de façon basale sur la membrane plasmique des interneurones striataux (Bernard *et al.*, 1998). Le traitement par un agoniste entraîne une perte d'environ 63% des récepteurs présents à la membrane, quantifiée par analyse d'image et non pas par mesure de liaison. Cependant, aucune étude cinétique n'a été réalisée principalement à cause de la lourdeur des manipulations à effectuer. C'est pour cette raison que grâce aux constructions récepteurs D_1-GFP nous avons cherché un moyen d'obtenir une expression de nos constructions *in vivo* dans le système nerveux.

Les micro-injections effectuées chez le poisson médaka n'ont pas permis pour le moment de réussir à faire exprimer le récepteur dans les cellules de l'embryon. Cependant, de nouvelles méthodes de transgenèse en cours de mise au point devraient permettre par la suite d'accéder plus facilement à l'intégration dans le génome des gènes d'intérêt par micro-injection. L'autre partie du travail effectuée sur les cultures primaires de striatum du rat a été très intéressante d'un point de vue biochimique. En effet nous avons réussi à reproduire les profils de désensibilisation que

nous avons observés pour le récepteur D_{1A} dans les cultures de striatum. Ce sous-type du récepteur D_1 est majoritaire dans le striatum, ce qui confirme la validité de nos résultats et de notre méthode. Malheureusement, les transfections de ces cultures ne nous ont pas permis d'atteindre un taux d'expression suffisant pour visualiser les récepteurs dans les neurones.

D'une manière générale, l'utilisation d'un modèle *in vivo* se heurte à ce problème de transfection. La plupart des méthodes chimiques ou mécaniques ne donne que de très faibles rendements d'expression pour les vecteurs injectés. Nous avons donc recherché une méthode qui donne une meilleure efficacité. Notre choix s'est porté vers le virus SFV (Semliki Forest Virus) qui a été utilisé pour l'expression de nombreuses protéines dans des tranches fines de cerveau où la survie des cellules est limitée à 9-10 jours (Ehrengruber *et al.*, 1999). Son utilisation pour l'infection de souris *in vivo* montre que trois jours après l'injection, le rapporteur ß-Galactosidase remplit le neurone entier et se trouve confiné à une région de 500 μm autour du point d'injection (Altmeyer *et al.*, 1999). A cause des taux d'expression très élevés obtenus avec ce vecteur, il y a une légère dispersion du marquage. Mais, le plus intéressant, et que l'on ne retrouve pas de localisation du transgène dans les cellules microgliales ou dans les cellules de type astrocytaire, ce qui était un de nos problèmes avec les transfections de cultures primaires de striatum du rat. L'expression est plus forte entre 3 et 9 jours après injection du virus, et elle diminue de façon importante après 12 jours. L'injection du SFV n'induit pas l'activation des astrocytes dans les 3 à 9 jours qui suivent l'injection. Ce virus est capable d'infecter une grande quantité de types cellulaires, et un grand nombre de récepteurs différents y ont été inséré (pour revue voir Lundstrom, 1999). Actuellement, une collaboration est en cours avec Ralf ALTMEYER pour faire exprimer à l'aide de ce virus les constructions D_1-GFP et obtenir ainsi un outil efficace pour l'expression *in vivo*.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'être prudent avec les vecteurs employés. En effet, la surexpression dans les neurones en culture provoque la distribution de la protéine d'intérêt dans tous les compartiments cellulaires, ce qui est largement non spécifique. Il apparaît alors des récepteurs dans les dendrites un peu plus tard après l'infection, comme c'est le cas pour le récepteur pIgR ou l'APP (pour revue voir Bradke et Dotti, 1998). Il est donc fondamental d'utiliser des neurones bien différenciés si l'on veut pouvoir analyser en culture primaire la répartition subcellulaire des sous-types du récepteur D_1 dans les neurones.

V. Analyse des relations des récepteurs de la dopamine et des voies d'activation MAPK

La voie MAPK la plus classiquement décrite, est celle qui est initiée par la stimulation des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Cette voie de signalisation intracellulaire comprend une suite d'interactions protéine-protéine et de phosphorylations conduisant à l'activation en série des protéines des familles Ras, Raf, MEK (ERK Kinase) et ERK. Les protéines Raf possèdent un rôle central dans la modulation de l'activité de cette voie, en participant à l'intégration des signaux émanant des différents seconds messagers (pour revue voir Marais et Marshall, 1996). Chez les vertébrés, trois membres composent cette famille de kinases: les protéines Raf-1, B-Raf et A-Raf (pour revue voir Daum *et al*., 1994). L'inactivation des gènes codant pour ces protéines, létale lors du développement embryonnaire, a révélé des phénotypes distincts (Pritchard *et al*., 1996; Wojnowski *et al*., 1998; Wojnowski *et al*., 1997), suggérant que ces kinases possèdent des fonctions qui ne sont ni redondantes, ni compensées chez les vertébrés. De plus, alors que la protéine Raf-1 est traduite dans tous les tissus de la souris adulte, les protéines B-Raf et A-Raf présentent des profils d'expression beaucoup plus restreints, respectivement dans le cerveau et les tissus uro-génitaux (Barnier *et al*., 1995; Storm *et al*., 1990).

Bien que les protéines Raf-1 et B-Raf soient toutes les deux exprimées dans la majorité des aires du cerveau (Morice *et al*., 1999), seule la protéine B-Raf a été purifiée comme l'activateur des MEK dans des extraits de cerveaux du rat (Moodie *et al*., 1994). La stimulation des protéines ERK, nécessaire à la différenciation neuronale des cellules PC12 induite par le NGF, est également consécutive à l'activation de B-Raf (Jaiswal *et al*., 1994). Pour les cellules PC12, l'acquisition du phénotype de type sympathique peut aussi être obtenu suite à l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc, qui emprunte alors la même voie de signalisation (B-Raf/MEK/ERK, Vossler *et al*., 1997). Des travaux de notre laboratoire (König *et al*., 2000) ont prouvé que la protéine B-Raf est directement phosphorylée par la PKA, suite à l'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc. L'identification des sites de phosphorylation concernés a révélé que l'un d'entre eux (sérine 429) n'est pas conservé au sein des protéines Raf-1 et A-Raf. L'expression de B-Raf, qui est forte dans les tissus neuronaux, semble donc permettre l'engagement d'une cellule vers la réalisation d'un programme cellulaire particulier (telle la différenciation) sous l'effet d'une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc.

V.A. Activation des voies des MAPK par les récepteurs D_1

Les récepteurs D_1 sont capables de provoquer cette augmentation du taux d'AMPc, et les données décrites dans l'Introduction (IV.C.4) nous laissent penser que des interactions sont donc possibles entre les récepteurs D_1 de la dopamine et les voies de signalisation des MAPK. Nous avons effectué des expériences préliminaires pour analyser la part des différentes voies de signalisation mises en jeu à la suite de la stimulation des différents sous-types du récepteur D_1. Les western blots des protéines MAPK phosphorylées ont démontré que dans les cellules HEK 293, on ne trouvait pas d'implication de la voie des JNK, mais une faible activation de celle de p38 et une activation forte et rapide de la voie ERK. Qui plus est, nous avons observé que le récepteur D_{1C} est capable d'activer la kinase p38, et l'on retrouve dans le western blot dirigé contre les formes phosphorylées des protéines ERK, une bande autour de 30 kDa qui n'est activée que pour le récepteur D_{1C}. Ces observations indiqueraient donc que le sous-type D_{1C} peut exercer une fonction réelle et distincte des autres sous-types. Cette bande de 30 kDa reste toutefois encore à caractériser. Des expériences de dosage de l'activité de ERK1, plusieurs éléments intéressants peuvent être soulignés. En effet, la mesure en présence de sérum dans le milieu de culture indique que d'un point de vue général, les récepteurs D_1 exprimés dans les cellules COS-7 sont capables de diminuer l'activité de ERK1 en présence de sérum, certainement plus physiologique qu'en son absence. Le taux basal n'est alors récupéré qu'après activation des récepteurs par la dopamine pendant 15 minutes. Toutefois, le substrat Elk, utilisé *in vitro* pour le dosage de l'activité n'est que peu sensible aux variations de l'activation de ERK1 en absence de sérum. En outre, il semble plus intéressant de regarder la cinétique de l'activité de ERK1 en présence de sérum. L'observation des gels de dosage de l'activité de ERK1 montre en fait d'autres bandes différentes de celle du substrat Elk qui sont modulées au cours du temps de stimulation par la dopamine. Si certaines variations des profils de phosphorylation semblent spécifiques de certains récepteurs, ces résultats doivent être pris avec précaution. En effet, ces premiers dosages n'ont pas encore été tous confirmés et il manque encore les vérifications nécessaires pour s'assurer de leur spécificité. En tout cas, les différences dans les profils observés entre les sous-types et le témoin transfecté par pcDNA3 indiquent que toutes ces variations sont bien spécifiques de l'activation des récepteurs D_1. En fait ces bandes correspondent à des protéines immunoprécipitées même en l'absence de ERK1 étiqueté HA dans les cellules, ce qui veut dire que ses bandes sont reconnues de façon non spécifique par l'anticorps anti-HA. Cependant ces résultats sont à rapprocher des mesures d'incorporation de phosphore marqué (^{32}P) dans des tranches de striatum qui ont été faites avec différentes concentrations de dopamine (Hanbauer et Sanna, 1986). L'analyse globale des protéines sur gel d'acrylamide montre une augmentation de l'incorporation de phosphate dans cinq bandes distinctes à 42, 45, 63, 74 et 94 kDa. Ces

modifications d'incorporation ne sont vraiment claires qu'après 15 minutes de traitement par la dopamine pour une concentration optimale de 10 μM. Il reste encore à carctériser ces bandes et confirmer ces modifications de profils observées.

V.B. Les récepteurs D_1 et la protéine B-Raf

Grâce à l'utilisation des lignées stables exprimant chaque sous-type du récepteur D_1, on pourra comprendre comment ces sous-types sont capables de réguler de façon différentielle les voies de signalisation contrôlant la prolifération ou la différenciation cellulaire. En couplant cette étude à l'emploi des mutants d'activité de B-Raf obtenus au laboratoire par Sandra KÖNIG, nous disposons d'outils pour l'analyse biochimique et cellulaire de ces voies de signalisation. Enfin, à l'aide des protéines fluorescentes et d'anticorps dirigés contre la protéine B-Raf, le suivi dynamique des mécanismes intervenant lors des phénomènes d'activation sera rendu possible. Cet aspect est intéressant car, la localisation précise des protéines B-Raf et Raf 1 dans le cerveau du rat, effectuée au laboratoire par Cécile MORICE (Morice *et al.*, 1999), a mis en évidence qu'elles sont présentes dans les mêmes neurones mais avec toutefois des localisations subcellulaires différentes. Ainsi Raf-1 est majoritairement observée autour du noyau alors que B-Raf est largement distribuée dans tout le corps cellulaire et dans les neurites. L'activation des voies de signalisation dépend de façon importante du contenu en facteurs de transduction des cellules. Ainsi une analyse comparative a été menée avec le récepteur A_{2A} de l'adénosine dans deux types cellulaires différents après transfection stable de ce récepteur (Seidel *et al.*, 1999). Dans les cellules CHO le récepteur A_{2A} active les MEK1 et 2 par une voie contenant la protéine G_s, l'adénylate cyclase, l'AMPc et les protéines Rap-1 et B-Raf. Par contre, dans les cellules HEK 293 où aucune isoforme de B-Raf n'a pu être détectée par western blot, l'activation des protéines MAPK par le récepteur A_{2A} passe par la protéine Ras sans intervention des voies de signalisation de l'AMPc. Ces résultats sont plutôt étonnants car un western blot réalisé dans le laboratoire sur les cellules HEK-293 a montré la présence dans les cellules HEK 293 de plusieurs isoformes de la protéine B-Raf. Si l'emploi des lignées stables ne peut pas comme prévu servir à l'expression de B-Raf dans un contexte où elle naturellement absente, il reste toutefois possible d'utiliser ces cellules pour surexprimer cette protéine et en analyser les conséquences sur le couplage des récepteurs D_1 aux voies des MAPK. Il est donc possible pour continuer cette partie du travail, d'évaluer les conséquences de la présence de B-Raf et Raf 1 sur l'activation des différentes voies MAPK observées pour chacun des sous-types du récepteur D_1. Les mutants d'activités de B-Raf pourront être transfectés pour comprendre si cette protéine intervient comme intermédiaire entre les récepteurs D_1 et la voie de signalisation ERK. On utilisera les différents

mutants de la protéine B-Raf pour tester en transfection dans les lignées stables le rôle des sérines régulatrices sur l'effet des récepteurs D_1 dépendant de B-Raf. Enfin, on pourra suivre la localisation des protéines B-Raf et des récepteurs D_1 dans les lignées stables à l'aide des constructions GFP.

Conclusion

A la suite des expériences réalisées pendant ma thèse, il semble évident que l'action d'un transmetteur sur une cellule, ne peut plus être limitée à l'analyse des effets d'un seul type de récepteur. L'existence de complexes macromoléculaires associant plusieurs récepteurs (dimérisation) et les protéines de leur voie de transduction permet à chaque cellule de s'adapter en permanence aux conditions extérieures du milieu. Un même récepteur est donc capable de provoquer une large gamme d'effets en fonction de la nature et de l'état de la cellule où il s'exprime. Face à cette variabilité, l'étude comparée permet de tirer des caractéristiques globales des récepteurs indépendamment des contextes cellulaires. En ce qui concerne la désensibilisation, il est clair que suivre les récepteurs au cours de leur trafic intracellulaire est une tâche difficile pour laquelle de nombreux progrès restent à faire. De même, il reste à déterminer les mécanismes exacts et les déterminants moléculaires des grandes étapes de la modulation de l'activité du récepteur. Cependant, nous avons montré que la cinétique de désensibilisation est une caractéristique propre de chacun des sous-types de récepteur D_1, tout comme l'activité basale de modulation de l'adénylate cyclase. Enfin et surtout, nos dernières expériences sur les voies des MAPK montrent que le récepteur D_{1C} a visiblement des caractéristiques fonctionnelles qui lui sont propres. En conséquence de quoi, sa fonction précise reste à déterminer chez les espèces qui l'expriment, tels que les poissons et les amphibiens.

Grâce à ce travail de thèse, il a été possible de discriminer chacun des sous-types sur la base de critères fonctionnels. Qui plus est, ces paramètres sont conservés au cours de l'évolution, chez l'ensemble des vertébrés à mâchoires, ce qui laisse penser qu'ils ont été sélectionnés tôt après la duplication des gènes. Cette caractérisitique s'observait déjà lors de la construction des arbres phylogénétiques puisqu'un récepteur comme le D_{1A} possède la séquence la plus conservée parmi toutes les espèces de vertébrés, y compris les agnathes. En revanche, les récepteurs D_{1B} et D_{1C}, apparus seulement chez les gnathostomes, possèdent des séquences dont les caractéristiques ont été fixées plus tard, après la duplication qui leur a donné naissance. En outre, les différences

dans les caractéristiques fonctionnelles indique que chacun des sous-types du récepteur D_1 possède un rôle physiologique précis et qu'il ne sont donc pas redondants. Cette remarque est intéressante pour le récepteur D_{1C} qui s'exprime dans un petit nombre de structure sûrement liées à des particularités d'action de la dopamine dans les espèces qui le possèdent.

Ce travail de thèse a permit aussi de souligner que s'il est possible de définir des caractères fonctionnels homologues pour les membres d'une famille de gènes, les relations structure-activité qui dépendent des séquences codantes ne sont pas suffisantes. Un certain degré de convergence peut rendre hasardeuse la définition de ces homologies. Il est important de réaliser que pour définir des homologies fonctionnelles les séquences codantes des récepteurs ne sont pas suffisante. L'opposition qui existe entre la similitude des régions codantes des récepteurs $ß_2$-adrénergiques et D_1 dopaminergiques et la différence des régions régulatrices des gènes correspondants, nous laisse penser qu'une partie de l'information évolutive se trouve sans doute dans ces régions de contrôle de l'expression. Ainsi, la modification, même minime, du lieu, de la durée ou du temps de déclenchement de la transcription peut avoir des conséquences beaucoup plus importantes sur l'évolution des espèces (Carroll, 2000). Le récepteur D_{1C} possède peut-être un profil d'expression spatial et temporel caractéristique au cours du développement ainsi que des fonctions chez l'adulte qui font que sa séquence est restée conservée au cours de l'évolution des vertébrés dans la plupart des groupes d'espèces, à l'exception des mammifères.

Dans cette thèse nous avons également montré que les mécanismes de régulation à court terme telle que la désensibilisation sont les éléments les plus important de la fonction du récepteur. En effet, les fonctions cellulaires du récepteur D_1 ne s'arrêtent pas uniquement à la transduction du signal à la membrane. Ainsi le découplage de la désensibilisation fonctionnelle et de l'endocytose, implique que les récepteurs de la dopamine interviennent dans d'autres mécanismes de régulation cellulaires tels que la plasticité de l'état de différenciation, la croissance neuritique, la mitose ou l'apoptose. En effet, il est probable que l'endocytose des récepteurs soit indispensable à l'activation des cascades de signalisation des MAPK. L'étude détaillée de cette biologie cellulaire des récepteurs et des voies de signalisation est sans aucun doute une des perspectives les plus intéressantes qu'ouvrent les résultats que nous avons présenté dans ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbracchio M.P., Colombo F., Luca M.D., Zaratin P. et Cattabeni F. (1987). Adenosine modulates the dopaminergic function in the nigro-striatal system by interacting with striatal dopamine dependent adenylate cyclase. *Pharmacol. Res. Com.*, **19,** 275-286.

Abe Y., Nakayama K., Yamanaka A., Sakurai T. et Goto K. (2000). Subtype-specific trafficking of endothelin receptors. *J. Biol. Chem.*, **275,** 8664-8671.

Achiriloaie M., Barylko B. et Albanesi J.P. (1999). Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cell. Biol.*, **19,** 1410-1415.

Ackerman J.M. et Gnegy M.E. (1990). Desensitization of the dopaminergic system in bovine retina following incubation with high potassium. *Brain Res.*, **521,** 296-302.

Allen L.F., Lefkowitz R.J., Caron M.G. et Cotecchia S. (1991). G-protein coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha-1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88,** 11354-11358.

Altmeyer R., Mordelet E., Girard M. et Vidal C. (1999). Expression and detection of macrophage-tropic HIV-1 gp120 in the brain using conformation-dependent antibodies. *Virology*, **259,** 314-323.

Andersen P.H., Gingrich J.A., Bates M.D., Dearry A., Falardeau P., Senogles S.E. et Caron M.G. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11,** 231-236.

Anderson R.G.W. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67,** 199-225.

Ariano M.A., Sortwell C.E., Ray M., Altemus K.L., Sibley D.R. et Levine M.S. (1997a). Agonist-induced morphologic decrease in cellular D-1A dopamine receptor staining. *Synapse*, **27,** 313-321.

Ariano M.A., Wang J., Noblett K.L., Larson E.R. et Sibley D.R. (1997b). Cellular distribution of the rat D1B receptor in central nervous system using anti-receptor antisera. *Brain Res.*, **746,** 141-50.

Arnauld E., Arsaut J. et Demotes-Mainard J. (1998). Conditional coupling of striatal dopamine D1 receptor to transcription factors: ontogenic and regional differences in CREB activation. *Mol. Brain Res.*, **60,** 127-132.

Arnt J., Hyttel J. et Sánchez C. (1992). Partial and full dopamine D1 receptor agonist in mice and rats: relation between behavioural effects and stimulation of adenylate cyclase activity in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, **213,** 259-267.

Aroeti B., Okhrimenko H., Reich V. et Orzech E. (1998). Polarized trafficking of plasma membrane proteins: emerging roles for coats, SNAREs, GTPases and their link to the cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376,** 57-90.

Arora R.C., Wunnicke V. et Meltzer H.Y. (1985). Effect of protein concentration on kinetic constants (Kd and Bmax) of 3H-imipramine binding in blood platelets. *Biol. Psychiatry*, **20,** 116-119.

Arriza J.L., Dawson T.M., Simerly R.B., Martin L.J., Caron M.G., Snyder S.H. et Lefkowitz R.J. (1992). The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J. Neurosci.*, **12,** 4045-4055.

Arvanitakis L., GerasRaaka E. et Gershengorn M.C. (1998). Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. *Trends Endocrin. Met.*, **9,** 27-31.

Audigier Y., Friedlander M. et Blobel G. (1987). Multiple topogenic sequences in bovine opsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84,** 5783-5787.

Awaji T., Hirasawa A., Kataoka M., Shinoura H., Nakayama Y., Sugawara T., Izumi S. et Tsujimoto G. (1998). Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of alpha(1b)-adrenoceptor with green fluorescent protein. *Mol. Endocrinol.*, **12,** 1099-1111.

B

Bairam A., Frenette J., Dauphin C., Carroll J.L. et Khandjian E.W. (1998). Expression of dopamine D1-receptor mRNA in the carotid body of adult rabbits, cats and rats. *Neurosci. Res.*, **31,** 147-154.

Ball G.F., Casto J.M. et Balthazart J. (1995). Autoradiographic localization of D1-like dopamine receptors in the forebrain of male and female Japanese quail and their relationship with immunoreactive tyrosine hydroxylase. *J. Chem. Neuroanat.*, **9,** 121-133.

Balmforth A.J., Warburton P. et Ball S.G. (1990). Homologous desensitization of the D1 dopamine receptor. *J. Neurochem.*, **55,** 2111-2116.

Bannykh S.I., Nishimura N. et Balch W.E. (1998). Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol.*, **8,** 21-25.

Barak L.S., Ferguson S.S.G., Zhang J. et Caron M.G. (1997a). A beta-arrestin green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **272,** 27497-27500.

Barak L.S., Ferguson S.S.G., Zhang J., Martenson C., Meyer T. et Caron M.G. (1997b). Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact $ß_2$-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol. Pharmacol.*, **51,** 177-184.

Barak L.S., Warabi K., Feng X., Caron M.G. et Kwatra M.M. (1999). Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and ß-arrestin 2 during homologous desensitization

of the substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, **274,** 7565-7569.

Barnier J.V., Papin C., Eychène A., Lecoq O. et Calothy G. (1995). The mouse B-*raf* gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.*, **270,** 23381-23389.

Barton A.C., Black L.E. et Sibley D.R. (1991). Agonist-induced desensitization of D2 dopamine receptors in human Y-79 retinoblastoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **39,** 650-658.

Barton A.C. et Sibley D.R. (1990). Agonist-induced desensitization of D_1-dopamine receptors linked to adenylyl cyclase activity in cultured NS20Y neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **38,** 531-541.

Bates M.D., Caron M.G. et Raymond J.R. (1991). Desensitization of DA1 dopamine receptors coupled to adenylyl cyclase in opossum kidney cells. *Am. J. Physiol.*, **260,** F937-F945.

Bates M.D., Olsen C.L., Becker B.N., Albers F.J., Middleton J.P., Mulheron J.G., Jin S.-L.C., Conti M. et Raymond J.R. (1993). Elevation of cAMP is required for down-regulation, but not agonist-induced desensitization, of endogenous dopamine D1 receptors in Opossum Kidney cells. *J. Biol. Chem.*, **268,** 14757-14763.

Beischlag T.V., Marchese A., Meador-Woodruff J.H., Damask S.P., O'Dowd B.F., Tyndale R.F., van Tol H.H., Seeman P. et Niznik H.B. (1995). The human dopamine D5 receptor gene: cloning and characterization of the 5'-flanking and promoter region. *Biochemistry*, **34,** 5960-70.

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

Benovic J.L., Strasser R.H., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1986). ß-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83,** 2797-2801.

Bergson C., Mrzljak L., Smiley J.F., Pappy M., Levenson R. et Goldman-Rakic P.S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J. Neurosci.*, **15,** 7821-7836.

Bernard V., Laribi O., Levey A.I. et Bloch B. (1998). Subcellular redistribution of m2 muscarinic acetylcholine receptors in striatal interneurons in vivo after acute cholinergic stimulation. *J. Neurosci.*, **18,** 10207-10218.

Bertorello A.M., Hopfield J.F., Aperia A. et Greengard P. (1990). Inhibition by dopamine of (Na+ + K+)ATPase activity in neostriatal neurons through D1 and D2 dopamine receptor synergism. *Nature*, **347,** 386-388.

Björklund A. et Lindfall O. (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: *Handbook of chemical neuroanatomy*, Volume 2. Edited by Elsevier, pp. 55-122.

Blanchet P.J., Grondin R., Bédard P.J., Shiosaki K. et Britton D.R. (1996). Dopamine D1 receptor desensitization profile in MPTP-lesioned primates. *Eur. J. Pharmacol.*, **309,** 13-20.

Blaxall B.C., Pellett A.C., Wu S.C., Pende A. et Port J.D. (2000). Purification and characterization of beta-adrenergic receptor mRNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **275,** 4290-4297.

Bockaert J. et Pin J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.*, **18,** 1723-1729.

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

Bonfanti L., Mironov A.A., Martínez-Menárguez J.A., Martella O., Fusella A., Baldassarre M., Buccione R., Geuze H.J., Mironov A.A. et Luini A. (1998). Procollagen traverses the golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*, **95,** 993-1003.

Bourne H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9,** 134-142.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72,** 248-254.

Bradke F. et Dotti C.G. (1998). Membrane traffic in polarized neurons. *Biochim. Biophys. Acta*, **1404,** 245-258.

Brakeman P.R., Lanahan A.A., R. O.B., Roche K., Barnes C.A., Huganir R.L. et Worley P.F. (1997). Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, **386,** 284-288.

Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A., Craven S.E., Santilano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C. et Bredt D.S. (1996). Interaction of nitric oxide syntase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, **84,** 757-767.

C

Cai G., Gurdal H., Smith C., Wang H.-Y. et Friedman E. (1999). Inverse agonist properties of dopaminergic antagonists at the D1A dopamine receptor: uncoupling of the D1A dopamine receptor from Gs protein. *Mol. Pharmacol.*, **56,** 989-996.

Caillé I., Dumartin B. et Bloch B. (1996). Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.*, **730,** 17-31.

Cao T.T., Deacon H.W., Reczek D., Bretscher A. et von Zastrow M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, **401,** 286-90.

Cao T.T., Mays R.W. et vonZastrow M. (1998). Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.*, **273,** 24592-24602.

Carbajal M.E., Valet J.P., Charest P.M. et Tanguay R.M. (1990). Purification of Drosophila hsp 83 and immunoelectron microscopic localization. *Eur. J. Cell Biol.*, **52,** 147-56.

Cardinaud B., Gibert J.-M., Liu F., Sugamori K.S., Vincent J.-D., Niznik H.B. et Vernier P. (1998). Evolution and origin of the diversity of dopamine receptors in vertebrates. *Adv. Pharmacol.*, **42,** 936-940.

Cardinaud B., Sugamori K.S., Coudouel S., Vincent J., Niznik H.B. et Vernier P. (1997). Early emergence of three dopamine D_1 receptor subtypes in vertebrates. *J. Biol. Chem.*, **272,** 2778-2787.

Carman C.V., Barak L.S., Chen C., Liu-Chen L.Y., Onorato J.J., Kennedy S.P., Caron M.G. et Benovic J.L. (2000). Mutational analysis of Gbetagamma and phospholipid interaction with G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **275,** 10443-10452.

Carman C.V. et Benovic J.L. (1998). G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8,** 335-344.

Carroll S.B. (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell*, **101,** 577-580.

Casto J.M. et Ball G.F. (1994). Characterization and localization of D1 dopamine receptors in the sexually dimorphic vocal control nucleus, area X, and the basal ganglia of European starlings. *J. Neurobiol.*, **25,** 767-780.

Ceresa B.P. et Schmid S.L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12,** 204-210.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. et Prasher D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker of gene expression. *Science*, **263,** 802-805.

Chang D.C. (1997) *Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells - Electroporation*, Volume 62.

Charpentier S., Jarvie K.R., Severynse D.M., Caron M.G. et Tiberi M. (1996). Silencing of the constitutive activity of the dopamine D1B receptor. *J. Biol. Chem.*, **271,** 28071-28076.

Chevesich J., Kreuz A.J. et Montell C. (1997). Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. *Neuron*, **18,** 95-105.

Chidiac P. (1998). Rethinking receptor-G protein-effector interactions. *Biochem. Pharmacol.*, **55,** 549-556.

Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T. et Hidaka H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, **265,** 5267-5272.

Chneiweiss H., Glowinski J. et Premont J. (1990). Dopamine-induced homologous and heterologous desensitizations of adenylate cyclase-coupled receptors on striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **189,** 287-292.

Cho W., Taylor L.P. et Akil H. (1996). Mutagenesis of residues adjacent to transmembrane prolines alters D1 dopamine receptor binding and signal transduction. *Mol. Pharmacol.*, **50,** 1338-1345.

Choi W.S., Machida C.A. et Ronnekleiv O.K. (1995). Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Mol. Brain Res.*, **31,** 86-94.

Chu G., Hayakawa H. et Berg P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res.*, **15,** 1311-1326.

Chun M., Liyanage U.K., Lisanti M.P. et Lodish H.F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 11728-11732.

Civelli O., Bunzow J.R. et Grandy D.K. (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **32,** 281-307.

Collins S., Bolanowski M.A., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1989). Genetic regulation of ß-adrenergic receptors. *Annu. Rev. Physiol.*, **51,** 203-215.

Conway Morris S. (2000). The Cambrian "explosion": slow-fuse or megatonnage? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97,** 4426-4429.

Coronas V., Feron F., Hen R., Sicard G., Jourdan F. et Moyse E. (1997). In vitro induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line. *J. Neurochem.*, **69,** 1870-1881.

Couve A., Filippov A.K., Connolly C.N., Bettler B., Brown D.A. et Moss S.J. (1998). Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J. Biol. Chem.*, **273,** 26361-26367.

Craven S.E. et Bredt D.S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell*, **93,** 495-498.

Creese I., Sibley D.R., Hamblin M.W. et Leff S.E. (1983). The classification of dopamine receptors: relationship to radioligand binding. *Annu. Rev. Neurosci.*, **6,** 43-71.

Cremona O. et De Camilli P. (1997). Synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7,** 232-330.

Cvejic S. et Devi L.A. (1997). Dimerization of the delta opiod receptor. *J. Biol. Chem.*, **272,** 26959-26964.

D

Daaka Y., Luttrell L.M., Ahn S., DellaRocca G.J., Ferguson S.S.G., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1998). Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **273,** 685-688.

Daaka Y., Pitcher J.A., Richardson M., Stoffel R.H., Robishaw J.D. et Lefkowitz R.J. (1997). Receptor and G beta gamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94,** 2180-2185.

Daum G., Eisenmann-Tappe I., Fries H., Troppmair J. et Rapp U.R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **19,** 474-480.

Daunt D.A., Hurt C., Hein L., Kallio J., Feng F. et Kobilka B.K. (1997). Subtype-specific intracellular trafficking of alpha(2)-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.*, **51,** 711-720.

De Vries L., Elenko E., McCaffery J.M., Fischer T., Hubler L., McQuistan N. et Farquhar M.G. (1998). RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for Galphai heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles. *Mol. Biol. Cell*, **9,** 1123-1134.

De Weerd W.F.C. et Leeb-Lundberg L.M.F. (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunit Galpha q and Galpha i in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **272,** 17858-17866.

Dearry A., Gingrich J.A., Falardeau P., Fremeau R.T., Jr., Bates M.D. et Caron M.G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, **347,** 72-6.

Demchyshyn L.L., McConkey F. et Niznik H.B. (2000). Dopamine D5 receptor agonist high affinity and constituive activity profile conferred by carboxyl terminal tail sequence. .

Demchyshyn L.L., Sugamori K.S., Lee F.J.S., Hamadanizadeh S.A. et Niznik H.B. (1995). The dopamine D1D receptor. *J. Biol. Chem.*, **270,** 4005-4012.

Denis J. et Collenot A. (1995). Taxinomie et embryologie: une connexion ancienne et fructueuse. *Médecine/sciences*, **12,** 1695-1706.

Dessauer C.W., Scully T.T. et Gilman A.G. (1997). Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **272,** 22272-22277.

Didsbury J.R., Uhing R.J., Tomhave E., Gerard C., Gerard N. et Snyderman R. (1991). Receptor class desensitization of leukocyte chemoattractant receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88,** 11564-11568.

Diviani D., Lattion A., Larbi N., Kunapuli P., Pronin A., Benovic J.L. et Cotecchia S. (1996). Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the α_{1B}-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **271,** 5049-5058.

Diviani D., Lattion A.L. et Cotecchia S. (1997). Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha(1B)-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **272,** 28712-28719.

Dotti C.G., Parton R.G. et Simons K. (1991). Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons. *Nature*, **349,** 158-161.

Dotti C.G. et Simons K. (1990). Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell*, **62,** 63-72.

Drago J., Gerfen C.R., Lachowicz J.E., Steiner H., Hollon T.R., Love P.E., Ooi G.T., Grinberg A., Lee E.J., Huang S., Bartlett P.F., Jose P.A., Sibley D.R. et Westphal H. (1994). Altered striatal function in a mutant mouse lacking D_{1A} dopamine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 12564-12568.

Drmota T., Gould G.W. et Milligan G. (1998). Real time visualization of agonist-mediated redistribution and internalization of a green fluorescent protein-tagged form of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.*, **273,** 24000-24008.

Dumartin B., Caille I., Gonon F. et Bloch B. (1998). Internalization of D1 dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *J. Neurosci.*, **18,** 1650-1661.

Dupree P., Parton R.G., Raposo G., Kurzchalia T.V. et Simons K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.*, **12,** 1597-1605.

Dynes J.L. et Ngai J. (1998). Pathfinding of olfactory neuron axons to stereotyped glomerular targets revealed by dynamic imaging in living zebrafish embryos. *Neuron*, **20,** 1081-1091.

E

Ehrengruber M.U., Lundstrom K., Schweitzer C., Heuss C., Schlesinger S. et Gahwiler B.H. (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96,** 7041-6.

Eisen J.A. (1998). Phylogenomics: Improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res.*, **8,** 163-167.

F

Felder C.C., Albrecht F.E., Campbell T., Eisner G.M. et Jose P.A. (1993). cAMP-independent, G protein-linked inhibition of Na+/H+ exchange in renal brush border by D1 dopamine agonists. *Am. J. Physiol.*, **264,** F1032-1037.

Felder C.C., Blecher M. et Jose P.A. (1989). Dopamine-1-mediated stimulation of phospholipase C activity in rat renal cortical membranes. *J. Biol. Chem.*, **264,** 8739-8745.

Ferguson S.S.G. (1998). Using green fluorescent protein to understand the mechanisms of G-protein-coupled receptor regulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31,** 1471-1477.

Ferguson S.S.G., Downey W.E., A-M. C., Barak L.S., Ménard L. et Caron M.G. (1996). Role of ß-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*, **271,** 363-366.

Feron O., Smith T.W., Michel T. et Kelly R.A. (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.*, **272,** 17744-17748.

Ferré S., Fredholm B.B., Morelli M., Popoli p. et Fuxe K. (1997). Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.*, **20,** 482-487.

Ferré S., O'Connor W.T., Svenningsson P., Björklund L., Lindberg J., Tinner B., Strömberg I., Goldstein M., Ögren S.O., Ungerstedt U., Fredholm B.B. et Fuxe K. (1996). Dopamine D1 receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in hte rat strioentopeduncular pathway and its modulation by adenosine A1 receptor-mediated mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, **8,** 1545-1553.

Ferré S., Popoli P., Giménez-Llort L., Finnman U.-B., Martínez E., Scotti de Carolis A. et Fuxe K. (1994). Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport*, **6,** 73-76.

Ferré S., Torvinen M., Antoniou K., Irenius E., Civelli O., Arenas E., Fredholm B.B. et Fuxe K. (1998). Adenosine A(1) receptor-mediated modulation of dopamine D-1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.*, **273,** 4718-4724.

Fiedler K. et Simons K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell*, **81,** 309-312.

Frail D.E., Manelli A.M., Witte D.G., Lin C.W., Steffey M.E. et MacKenzie R.G. (1993). Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from Goldfish retina: stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization. *Mol. Pharmacol.*, **44,** 1113-1118.

Fraser C.M. (1990) Expression of receptor genes in cultured cells. In: *Receptor Biochemistry*. Edited by H. E.C.: IRL Press, pp. 263-275.

Fredericks Z.L., Pitcher J.A. et Lefkowitz R.J. (1996). Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human ß2-adrenergic receptora. *J. Biol. Chem.*, **271,** 13796-13803.

Freedman N.J., Liggett S.B., Drachman D.E., Pei G. et Caron M.G. (1995). Phosphorylation and desentization of the human ß1-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **270,** 17953-17961.

Fryxell K.J. (1995). The evolutionary divergence of neurotransmitter receptors and second-messenger pathways. *J. Mol. Evol.*, **41,** 85-97.

Füllekrug J. et Nilsson T. (1998). Protein sorting in the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1404,** 77-84.

Fuxe K., Ferre S., Zoli M. et Agnati L.F. (1998). Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A(2A) dopamine D-2 and adenosine A(1) dopamine D-1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Rev.*, **26,** 258-273.

G

Gagnon A.W., Kallal L. et Benovic J.L. (1998). Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta(2)-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **273,** 6976-6981.

Gaidarov I., Krupnick J.G., Falck J.R., Benovic J.L. et Keen J.H. (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.*, **18,** 871-881.

García-Cardeña G., Oh P., Liu J., Schnitzer J.E. et Sessa W.C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93,** 6448-6453.

Gaspar P., Bloch B. et Le Moine C. (1995). D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **7,** 1050-63.

George S.R., Lee S.P., Varghese G., Zeman P.R., Seeman P., Ng G.Y.K. et ODowd B.F. (1998). A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J. Biol. Chem.*, **273,** 30244-30248.

Gerdes H. et Kaether C. (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett.*, **389,** 44-47.

Gether U. et Kobilka B.K. (1998). G protein-coupled receptors - II. Mechanism of agonist activation. *J. Biol. Chem.*, **273,** 17979-17982.

Gingrich J.A. et Caron M.G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16,** 299-321.

Goodman O.B., Krupnick J.G., Santini F., Gurevich V.V., Penn R.B., Gagnon A.W., Keen J.H. et Benovic J.L. (1996). ß-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the ß2-adrenergic receptor. *Nature*, **383,** 447-450.

Goodnight J.A., Mischak H., Kolch W. et Mushinski J.F. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **270,** 9991-10001.

Gouldson P.R., Snell C.R., Bywater R.P., Higgs C. et Reynolds C.A. (1998). Domain swapping in G-protein coupled receptor dimers. *Protein Engineering*, **11,** 1181-1193.

Grenader A.C., O'Rourke D.A. et Healy D.P. (1995). Cloning of the porcine D1A dopamine receptor gene expressed in renal epithelial LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.*, **268,** F423-F434.

Gunning P., Weinberger R., Jeffrey P. et Hardeman E. (1998). Isoform sorting and the creation of intracellular compartments. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14,** 339-372.

Gupta S.K. et Mishra R.K. (1993). Desensitization of D1 dopamine receptors down-regulates the Gsalpha subunit of G protein in SK-N-MC neuroblastoma cells. *J. Mol. Neurosci.*, **4,** 117-123.

Gutkind J.S. (1998a). Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, **17,** 1331-1342.

Gutkind J.S. (1998b). The pathways connecting G Protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.*, **273,** 1839-1842.

H

Hadcock J.R., Wang H. et Malbon C.C. (1989). Agonist-induced destabilization of ß-adrenergic receptor mRNA. *J. Biol. Chem.*, **264,** 19928-19933.

Haga T., Haga K. et Hulme E.C. (1990) Solubilization, purification, and molecular characterization of receptors: principles and strategy. In: *Receptor Biochemistry*. Edited by H. E.C.: IRL Press, pp. 1-50.

Hall A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279,** 509-514.

Hall R.A., Premont R.T., Chow C.-W., Blitzer J.T., Pitcher J., Claing A., Stoffel R.H., Barak L.S., Shenolikar S., Weinman E.J., Grinstein S. et Lefkowitz R.J. (1998). The ß2-adrenergic receptor interacts with the Na+/H+-exchanger regulatory factor to control Na+/H+ exchange. *Nature*, **392,** 626-630.

Hamm H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.*, **273,** 669-672.

Hanbauer I. et Sanna E. (1986). Molecular mechanisms involved in the desensitization of dopamine receptors in slices of corpus striatum. *Prog. Brain Res.*, **69,** 161-168.

Hausdorff W.P., Bouvier M., O'Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the ß2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J. Biol. Chem.*, **264,** 12657-12665.

Hausdorff W.P., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1990). Turning off the signal: desensitization of ß-adrenergic receptor function. *FASEB J.*, **4,** 2881-2889.

Hébert T.E. et Bouvier M. (1998). Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem. Cell Biol.*, **76,** 1-11.

Hébert T.E., Loisel T.P., Adam L., Ethier N., St Onge S. et Bouvier M. (1998). Functional rescue of a constitutively desensitized ß2AR through receptor dimerization. *Biochem. J.*, **330,** 287-293.

Hébert T.E., Moffet S., Morello J.-P., Loisel T.P., Bichet D.G., Barret C. et Bouvier M. (1996). A peptide derived from a ß2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.*, **271,** 16384-16392.

Heim R., Cubitt A.B. et Tsien R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, **373,** 663-664.

Heim R., Prasher D.C. et Tsien R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 12501-12504.

Heim R. et Tsien R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, **6,** 178-182.

Hein L., Meinel L., Pratt R.E., Dzau V.J. et Kobilka B.K. (1997). Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT(1) and AT(2) receptors: Evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol. Endocrinol.*, **11,** 1266-1277.

Herr S., Pepperkok R., Saff R., Wiemann S. et Ansorge W. (1994) Electroporation of Cells. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Volume 3. Edited by J. Celis: Academic Press, pp. 37-43.

Hersch S.M., Ciliax B.J., Gutekunst C.-A., Rees H.D., Heilman C.J., Yung K.K.L., Bolam J.P., Ince E., Yi H. et Levey A.I. (1995). Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J. Neurosci.*, **15,** 5222-5237.

Herz J.M., Thomsen W.J. et Yarbrough G.G. (1997). Molecular approaches to receptors as targets for drug discovery. *J. Recept. Signal Tr. R.*, **17,** 671-776.

Hirano J., Archer S.N. et Djamgoz M.B.A. (1998). Dopamine receptor subtypes expressed in vertebrate (carp and eel) retinae: Cloning, sequencing and comparison of five D-1-like and three D-2-like receptors. *Receptor. Channel.*, **5,** 387-404.

Holland P.W. et Garcia-Fernàndez J. (1996). *Hox* genes and chordate evolution. *Dev. Biol.*, **173,** 382-395.

Holtbäck U., Brismar H., DiBona G., Fu M. et Greengard P. (1999). Receptor recruitement: a mechanism for interactions between G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96,** 7271-7275.

Homburger V., Lucas M., Cantau B., Barabe J., Penit J. et Bockaert J. (1980). Further evidence that desensitization of ß-adrenergic-sensitive adenylate cyclase proceeds in two steps. *J. Biol. Chem.*, **255,** 10436-10444.

Hong W. (1998). Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.*, **111,** 2831-2839.

Horiuchi A., Takeyasu K., Mouradian M.M., Jose P.A. et Felder R.A. (1993). D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na+/K(+)-ATPase activity through protein kinase A. *Mol. Pharmacol.*, **43,** 281-285.

Huang C.F., Duncan J.A., Gilman A.G. et Mumby S.M. (1999). Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96,** 412-417.

Huang C.F., Hepler J.R., Chen L.T., Gilman A.G., Anderson R.G.W. et Mumby S.M. (1997). Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*, **8,** 2365-2378.

Huang Q., Zhou D., Chase K., Gusella J.F., Aronin N. et DiFiglia M. (1992). Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89,** 11988-11992.

Hunyady L. (1999). Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10,** S47-S56.

Hurley J.H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, **274,** 7599-7602.

I

Ikonen E. et Simons K. (1998). Protein and lipid sorting from the trans-golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **9,** 503-509.

Imafuku I., Kamei M., Kanazawa I., Mouradian M.M. et Okazawa H. (1996). POU transcription factors differentially regulate the D1A dopamine receptor gene in cultured cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **222,** 736-41.

Imperato A., Obinu M.C., Carta G., Mascia M.S., Casu M.A., Dazzi L. et Gessa G.L. (1994). Neuroleptics cause stimulation of dopamine D1 receptors and their desensitization after chronic treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, **264,** 55-60.

Inglese J., Freedman N.J., Koch W.J. et Lefkowitz R.J. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.*, **268,** 23735-23738.

Inglese J., Koch W.J., Touhara K. et Lefkowitz R.J. (1995). Gβγ interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.*, **20,** 151-155.

Ito K., Haga T., Lameh J. et Sadée W. (1999). Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled recepetor kinases 2 or 5. *Eur. J. Biochem.*, **260,** 112-119.

Iwami G., Kawabe J.-I., Ebina T., Cannon P.J., Homcy C.J. et Ishikawa Y. (1995). Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, **270,** 12481-12484.

Iwasow R.M. et Nantel M.-F. (1999). Delineation of the structural basis for the activation properties of the dopamine D1 receptor subtypes. *J. Biol. Chem.*, **274,** 31882-31890.

J

Jaiswal R.K., Moodie S.A., Wolfman A. et Landreth G.E. (1994). The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol. Cell. Biol.*, **14,** 6944-53.

Jarvie K.R., Tiberi M., Silvia C., Gingrich J.A. et Caron M.G. (1993). Molecular cloning, stable expression and desentization of the human dopamine D1B/D5 receptor. *J. Receptor Res.*, **13,** 573-590.

Jensen A.A., Pedersen U.B., Din N. et Andersen P.H. (1996). The dopamine D_1 recetor family: structural and functional aspects. *Biochem. Soc. T.*, **24,** 163-169.

Jensen A.A., Pedersen U.B., Kiemer A., N. D. et Andersen P.H. (1995). Functionnal importance of the carboxy tail cysteine residues in the human D1 dopamine receptor. *J. Neurochem.*, **65,** 1325-1331.

Jewell-Motz E.A. et Liggett S.B. (1996). G protein-coupled receptor kinase specificity for phosphorylation and desensitization of α2-adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.*, **271,** 18082-18087.

Jiang D. et Sibley D.R. (1999). Regulation of D1 dopamine receptors with mutations of protein kinase phosphorylation sites: attenuation of the rate of agonist-induced desensitization. *Mol. Pharmacol.*, **56,** 675-683.

Jin H., Nip S., O'Dowd B.F. et George S.R. (1998). D1 Dopamine receptor activity is not altered by a mutation in the first intracellular loop. *Biochim. Biophys. Acta*, **1402,** 165-170.

Jin H., Xie Z., George S.R. et O'Dowd B.F. (1999). Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **386,** 305-312.

Jin H., Zastawny R., George S.R. et ODowd B.F. (1997). Elimination of palmitoylation sites in the human dopamine D-1 receptor does not affect receptor-G protein interaction. *Eur. J. Pharmacol.*, **324,** 109-116.

Johnson R.A., Alvarez R. et Salomon Y. (1994). Determination of adenylyl cyclase catalytic activity using single and double column procedures. *Method. Enzymol.*, **238,** 31-56.

Johnson R.A. et Salomon Y. (1991). Assay of adenylyl cyclase catalytic activity. *Method. Enzymol.*, **195,** 3-21.

Jou T.S. et Nelson W.J. (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J. Cell Biol.*, **142,** 85-100.

K

Kain S.R., Adams M., Kondepudi A., Yang T., Ward W.W. et Kitts P. (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *BioTechniques*, **19,** 650-655.

Kain S.R. et Kitts P. (1997) *Expression and detection of green fluorescent protein (GFP)*, Volume 63.

Kapsimali M., Vidal B., Gonzalez A., Dufour S. et Vernier P. (2000). Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D(1) receptor subtypes in the brain of the european eel (*Anguilla anguilla*): comparative approach to the function of D(1) receptors in vertebrates. *J. Comp. Neurol.*, **419,** 320-43.

Karpa K.D., Lidow M.S., Pickering M.T., Levenson R. et Bergson C. (1999). N-linked glycosylation is required for plasma membrane localization of D5, but not D1, dopamine receptors in transfected mammalian cells. *Mol. Pharmacol.*, **56,** 1071-1078.

Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A. et Bettler B. (1998). GABAb-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, **396,** 683-687.

Kebabian J.W. et Calne D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277,** 93-96.

Keefer J.K. et Limbird L.E. (1993). The alpha2A-adrenergic receptor is targeted directly to the basolateral membrane domain of Madin-Darby Canine Kidney Cells independent of coupling to pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **268,** 11340-11347.

Keller P. et Simons K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci.*, **110,** 3001-3009.

Kim S.K. (1997). Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9 ,** 853-859.

Kimura K., White B.H. et Sidhu A. (1995). Coupling of human D-1 dopamine receptors to different guanine nucleotide binding proteins. Evidence that D-1 dopamine receptors can couple to both Gs and G(o). *J. Biol. Chem.*, **270,** 14672-14678.

Kitai S.T. et Surmeier D.J. (1993). Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.*, **60,** 40-52.

Kong G., Penn R. et Benovic J.L. (1994). A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **269,** 13084-13087.

König S., Guibert B., Morice C., Vernier P. et Barnier J.V. (2000). MAP kinase/ERK activation in response to cAMP: phosphorylation by PKA of a site unique to B-Raf. *Oncogene*, **soumis**.

Kozak M. (1986). Point mutation define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44,** 283-292.

Kozak M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15,** 8125-8148.

Kozell L.B., Machida C.A., Neve R.L. et Neve K.A. (1994). Chimeric D1/D2 dopamine receptors. *J. Biol. Chem.*, **269,** 30299-30306.

Kozell L.B. et Neve K.A. (1997). Constitutive activity of a chimeric D-2/D-1 dopamine receptor. *Mol. Pharmacol.*, **52,** 1137-1149.

Kreegipuu A., Blom N. et Brunak S. (1999). PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Res.*, **27,** 237-239.

Kreis T.E. (1986). Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesiculer stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.*, **5,** 931-941.

Krueger K.M., Daaka Y., Pitcher J.A. et Lefkowitz R.J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *J. Biol. Chem.*, **272,** 5-8.

Kumar S. et Hedges S.B. (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, **392,** 917-920.

Kunapuli P., Onorato J.J., Hosey M.M. et Benovic J.L. (1994). Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.*, **269,** 1099-1105.

L

Laitinen J. (1993). Dopamine stimulates K+ efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J. Neurochem.*, **61,** 1461-1469.

Lamers A.E., Groneveld D., de Kleijn D.P., Geeraedts F.C., Leunissen J.A., Flik G., Wendelaar Bonga S.E. et Martens G.J. (1996). Cloning and sequence analysis of a hypothalamic cDNA encoding a D1c

dopamine receptor in tilapia. *Biochim. Biophys. Acta*, **1308,** 17-22.

Langlois X., el Mestikawy S., Arpin M., Triller A., Hamon M. et Darmon M. (1996). Differential addressing of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in transfected LLC-PK1 epithelial cells: a model of receptor targeting in neurons. *Neuroscience*, **74,** 297-302.

Laporte S.A., Oakley R.H., Holt J.A., Barak L.S. et Caron M.G. (2000). The interaction of ß-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of ß2-adrenergic into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.*, **275,** 23120-23126.

Lasley R.D., Narayan P., Uittenbogaard A. et Smart E.J. (2000). Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. *J. Biol. Chem.*, **275,** 4417-4421.

Le Borgne R. et Holflack B. (1998). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1404,** 195-209.

Le Moine C. et Bloch B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.*, **355,** 418-26.

Le Moine C. et Gaspar P. (1998). Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Mol. Brain Res.*, **58,** 231-236.

Le Moine C., Normand E. et Bloch B. (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88,** 4205-4209.

Lee S.H., Minowa M.T. et Mouradian M.M. (1996). Two distinct promoters drive transcription of the human D1A dopamine receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **271,** 25292-9.

Lee S.H., Wang W., Yajima S., Jose P.A. et Mouradian M.M. (1997). Tissue-specific promoter usage in the D1A dopamine receptor gene in brain and kidney. *DNA Cell Biol.*, **16,** 1267-75.

Lemmon M.A. et Ferguson K.M. (1998) Pleckstrin homology domains. In: *Protein Modules in Signal Transduction*, Volume 228, pp. 39-74.

Leurs R., Smit M.J., Alewijnse A.E. et Timmerman H. (1998). Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem. Sci.*, **23,** 418-422.

Levey A.I., Hersch S.M., Rye D.B., Sunahara R.K., Niznik H.B., Kitt C.A., Price D.L., Maggio R., Brann M.R. et Ciliax B.J. (1993). Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90,** 8861-8865.

Lewis M.M., Watts V.J., Lawler C.P., Nichols D.E. et Mailman R.B. (1998). Homologous desensitization of the D-1A dopamine receptor: Efficacy in causing desensitization dissociates from both receptor occupancy and functional potency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286,** 345-353.

Leysen J.E. et Gommeren W. (1981). Optimal conditions for [3H]apomorphine binding and anomalous equilibrium binding of [3H]apomorphine and [3H]spiperone to rat striatal membranes: involvement of surface phenomena versus multiple binding sites. *J. Neurochem.*, **36,** 201-219.

Lezcano N., Mrzljak L., Eubanks S., Levenson R., Goldman-Rakic P. et Bergson C. (2000). Dual signaling regulated by calcyon, a D1 dopamine receptor interacting protein. *Science*, **287,** 1660-1664.

Li S., Couet J. et Lisanti M.P. (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. *J. Biol. Chem.*, **271,** 29182-29190.

Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J.E., Hansen S.H., Nishimoto I. et Lisanti M.P. (1995). Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.*, **270,** 15693-15701.

Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C. et Kain S.R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, **273,** 34970-5.

Lin C.W., Bianchi B.R., Miller T.R., Stashko M.A., Wang S.S., Curzon P., Bednarz L., Asin K.E. et Britton D.R. (1996). Persisitent activation of the dopamine D1 receptor contributes to prolonged receptor desensitization: studies with A-77636. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276,** 1022-1029.

Lin C.W., Miller T.R., Witte D.G., Bianchi B.R., Stashko M., Manelli A.M. et Frail D.E. (1995). Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells. *Mol. Pharmacol.*, **47,** 131-139.

Lin D. et Pawson T. (1997). Protein modules in signal transduction. *Trends Cell Biol.*, **10,** pull-out centrefold.

Lin F.-T., Krueger K.M., Kendall H.E., Daaka Y., Fredericks Z.L., Pitcher J.A. et Lefkowitz R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the ß-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of ß-arrestin1. *J. Biol. Chem.*, **272,** 31051-31057.

Lin H.C., Duncan J.A., Kozasa T. et Gilman A.G. (1998). Sequestration of the G protein beta gamma subunit complex inhibits receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95,** 5057-5060.

Liu F., Wan Q., Pristupa Z.B., Yu X.M., Wang Y.T. et Niznik H.B. (2000). Direct protein-protein coupling

enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature*, **403,** 274-280.

Liu J.-P., Yajima Y., Li H., Ackland S., Akita Y., Stewart J. et Kawashima S. (1997). Molecular interactions between dynamin and G protein ßgamma-subunits in neuroendocrine cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **132,** 61-71.

Liu Y., Civelli O., Zhou Q.-Y. et Albert P. (1992). Cholera toxin-sensitive 3',5' -cyclic adenosine monophosphate and calcium signals of the human dopamine-D1 receptor: selective potentiation by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.*, **6,** 1815-1824.

Lohse M.J., Benovic J.L., Codina J., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1990). ß-arrestin: a protein that regulates ß-adrenergic receptor function. *Science*, **248,** 1547-1550.

Lorenz W., Inglese J., Palczewski K., Onorato J.J., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1991). The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the ß-adrenergic receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88,** 8715-8719.

Lowe M. et Kreis T.E. (1998). Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim. Biophys. Acta*, **1404,** 53-66.

Ludin B. et Matus A. (1998). GFP illuminates the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.*, **8,** 72-77.

Lundstrom K. (1999). Alphaviruses as tools in neurobiology and gene therapy. *J. Recept. Signal Tr. R.*, **19,** 673-686.

Luo L., Hensch T.K., Ackerman L., Barbel S., Jan L.Y. et Jan Y.N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, **379,** 837-840.

Lutrell L.M., Daaka Y. et Lefkowitz R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11,** 177-183.

M

Macrae A.D. et Brenner S. (1995). Analysis of the dopamine receptor family in the compact genome of the puffer fish Fugu rubripes. *Genomics*, **25,** 436-446.

Maggio R., Vogel Z. et Wess J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90,** 3103-3107.

Mahan L.C., Burch R.M., Monsma F.J. et Sibley D.R. (1990). Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositiol phosphate production and Ca2+ mobilization in Xenopus oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87,** 2196-2200.

Mansour A., Meador-Woodruff J.H., Zhou Q.Y., Civelli O., Akil H. et Watson S.J. (1991). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience*, **45,** 359-371.

Marais R. et Marshall C.J. (1996). Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Sur.*, **27,** 101-125.

Marien M.R., Shin S.H., Coper G.R. et Jhamandas K. (1984). Stability of dopamine in an *in vitro* incubation system using Medium 199. *Can. J. Physiol. Pharm.*, **62,** 600-603.

Marullo S., Nantel F., Strosberg A.D. et Bouvier M. (1995). Variability in the regulation of ß-adrenoreceptor subtypes. *Biochem. Soc. T.*, **23,** 126-128.

Maudsley S., Pierce K.L., Zamah M., Miller W.E., Ahn S., Daaka Y., Lefkowitz R.J. et Luttrell L.M. (2000). The ß2-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **275,** 9572-9580.

McMillian M.K., He W.P., Hong J.S. et Pennypacker K.R. (1992). Dopamine stimulates [3H]phorbol 12, 13-dibutyrate binding in cultured striatal cells. *J. Neurochem.*, **58,** 1308-1312.

Meloche S., Pages G. et Pouyssegur J. (1992). Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol. Biol. Cell*, **3,** 63-71.

Memo M., Lovenberg W. et Hanbauer I. (1982). Agonist-induced subsensitivity of adenylate cyclase coupled with a dopamine receptor in slices from rat corpus striatum. *Neurobiology*, **79,** 4456-4460.

Ménard L., Ferguson S.S.G., Barak L.S., Bertrand L., Premont R.T., Colapietro A., Lefkowitz R.J. et Caron M.G. (1996). Members of the G protein-coupled receptor kinase family that phosphorylate the ß2-adrenergic receptor facilitate sequestration. *Biochemistry*, **35,** 4155-4160.

Meyer A. (1998). Developmental biology - Hox gene variation and evolution. *Nature*, **391,** 225.

Minowa M.T., Lee S.H. et Mouradian M.M. (1996). Autoregulation of the human D1A dopamine receptor gene by cAMP. *DNA Cell Biol.*, **15,** 759-67.

Minowa M.T., Minowa T., Monsma F.J., Sibley D.R. et Mouradian M.M. (1992). Characterization of the 5' flanking region of the human D1A dopamine receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89,** 3045-3049.

Minowa M.T., Minowa T. et Mouradian M.M. (1993). Activator region analysis of the human D1A dopamine receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **268,** 23544-23551.

Moffet S., Brown D.A. et Linder M.E. (2000). Lipid-dependent targeting of G protein into rafts. *J. Biol. Chem.*, **275,** 2191-2198.

Moffet S., Mouillac B., Bonin H. et Bouvier M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns

of a human ß2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.*, **12,** 349-356.

Monnot C., Bihoreau C., Conchon S., Curnow K.M., Corvol P. et Clauser E. (1996). Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.*, **271,** 1507-1513.

Monsma F.J., Mahan L.C., McVittie L.D., Gerfen C.R. et Sibley D.R. (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87,** 6723-6727.

Moodie S.A., Paris M.J., Kolch W. et Wolfman A. (1994). Association of MEK1 with p21(ras)center dot GMPPNP is dependent on B-Raf. *Mol. Cell. Biol.*, **14,** 7153-7162.

Morello J.-P. et Bouvier M. (1996). Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem. Cell Biol.*, **74,** 449-457.

Morice C., Nothias F., König S., Vernier P., Baccarini M., Vincent J.-D. et Barnier J.V. (1999). Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, **11,** 1995-2006.

Morrison K.J., Moore R.H., Carsrud N.D.V., Trial J., Millman E.E., Tuvim M., Clark R.B., Barber R., Dickey B.F. et Knoll B.J. (1996). Repetitive endocytosis and recycling of the ß2-adrenergic receptor during agonist-induced steady state redistribution. *Mol. Pharmacol.*, **50,** 692-699.

Mukherjee S., Ghosh R.N. et Maxfield F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol. Rev.*, **77,** 759-803.

Muly E.C., Szigeti K. et Goldman-Rakic P.S. (1998). D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: Distribution and subcellular localization. *J. Neurosci.*, **18,** 10553-10565.

Murga C., Esteban N., Ruiz-Gomez A. et Mayor F. (1997). The basal subcellular distribution of ß-adrenergic receptor kinase is independent of G-protein ßGamma subunits. *FEBS Lett.*, **409,** 24-28.

N

Nantel F., Bonin H., Emorine L.J., Zilberfarb V., Strosberg A.D., Bouvier M. et Marullo S. (1993). The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol. Pharmacol.*, **43,** 548-555.

Nash S.R., Godinot N. et Caron M.G. (1993). Cloning and characterization of the opossum kidney cell D1 dopamine receptor: expression of identical D1A and D1B dopamine receptor mRNAs in opossum kidney and brain. *Mol. Pharmacol.*, **44,** 918-925.

Näsman J., Jansson C.C. et Akerman K.E.O. (1997). The second intracellular loop of the alpha(2)-adrenergic receptors determines subtype-specific coupling to cAMP production. *J. Biol. Chem.*, **272,** 9703-9708.

Neubig R.R. (1998). Specificity of receptor-G protein coupling: Protein structure and cellular determinants. *Semin. Neurosci.*, **9,** 189-197.

Ng G.Y., Mouillac B., George S.R., Caron M., Dennis M., Bouvier M. et O'Dowd B.F. (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **267,** 7-19.

Ng G.Y., Trogadis J., Stevens J., Bouvier M., O'Dowd B. et George S.R. (1995). Agonist-induced desensitization of dopamine D1 receptor-stimulated adenylyl cyclase activity is temporally and biochemically separated from D1 receptor internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92,** 10157-10161.

Ng G.Y.K., O'Dowd B.F., Lee S.P., Chung H.T., Brann M.R., Seeman P. et George S.R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **227,** 200-204.

Nimchinsky E.A., Hof P.R., Janssen W.G.M., Morrison J.H. et Schmauss C. (1997). Expression of dopamine D-3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. *J. Biol. Chem.*, **272,** 29229-29237.

Niznik H.B., Otsuka N.Y., Dumbrille-Ross A., Grigoriadis D., Tirpak A. et Seeman P. (1986). Dopamine D1 receptors characterized with [3H]SCH 23390. *J. Biol. Chem.*, **261,** 8397-8406.

Nordstedt C. et Fredholm B.B. (1990). A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal. Biochem.*, **189,** 231-234.

O

O'Dowd B.F. (1993). Structures of dopamine receptors. *J. Neurochem.*, **60,** 804-813.

O'Dowd B.F., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J. et Bouvier M. (1989). Palmitoylation of the human ß2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **264,** 7564-7569.

Ofori S., Bugnon O. et Schorderet M. (1993). Agonist-induced desensitization of dopamine D1 receptors in bovine retina and rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266,** 350-357.

Ogawa N. (1995). Molecular and chemical neuropharmacology of dopamine receptor. *Acta Med. Okayama*, **49,** 1-11.

Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E. et Lisanti M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **273,** 5419-5422.

Okazawa H., Imafuku I., Minowa M.T., Kanazawa I., Hamada H. et Mouradian M.M. (1996). Regulation of striatal D1A dopamine receptor gene transcription by Brn- 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93,** 11933-8.

Olson M.F. et Schimmer B.P. (1992). Heterologous desentitization of the human dopamine D1 receptor in Y1 adrenal cells and in a desentization-resistant Y1 mutant. *Mol. Endocrinol.*, **6,** 1095-1102.

Opperman M., Diversé-Pierluissi M., Drazner M.H., Dyer S.L., Freedman N.J., Peppel K.C. et Lefkowitz R.J. (1996). Monoclonal antibodies reveal receptor specificity among G-protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93,** 7649-7654.

Ozaki N., Moroi K., Kadota T., Suzuki S. et Kadota K. (1994). Dopamine D1 and D2 receptors and their signal system present in coated vesicles prepared from bovine striatal tissue. *J. Neurochem.*, **62,** 582-591.

P

Paolillo M., Feliciello A., Porcellini A., Garbi C., Bifulco M., Schinelli S., Ventre C., Stabile E., Ricciardelli G., Schettini G. et Avvedimento E.V. (1999). The type and the localization of cAMP-dependent protein kinase regulate transmission of cAMP signals to the nucleus in cortical and cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.*, **274,** 6546-6552.

Pari G.S. et Keown W.A. (1997) *Experimental strategies in efficient transfection of mammalian cells - Calcium phosphate and DEAE-dextran*, Volume 62.

Pauwels P.J. et Wurch T. (1998). Amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors - Review. *Mol. Neurobiol.*, **17,** 109-135.

Pawson T. et Scott J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278,** 2075-2080.

Pedersen U.B., Norby B., Jensen A.A., Schiødt M., Hansen A., Suhr-Jessen P., Scheideler M., Thastrup O. et Andersen P.H. (1994). Characteristics of stably expressed human dopamine D1a and D1b receptors: atypical behavior of the dopamine D1b receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **267,** 85-93.

Pei G., Samama P., Lohse M., Wang M., Codina J. et Lefkowitz R.J. (1994a). A constitutively active mutant ß2-adrenergic receptor is constitutively desensitized and phosphorylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 2699-2702.

Pei G., Tiberi M., Caron M.G. et Lefkowitz R.J. (1994b). An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an *in vitro*-purified membrane assy reveals differential receptor specificity and regulation by Gßγ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 3633-3636.

Perez D.M., Hwa J., Gaivin R., Mathur M., Brown F. et Graham R.M. (1996). Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol. Pharmacol.*, **49,** 112-122.

Peters K.G., Rao P.S., Bell B.S. et Kindman L.A. (1995). Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live *Zebrafish* embryos. *Dev. Biol.*, **171,** 252-257.

Pippig S., Andexinger S., Daniel K., Puzicha M., Caron M.G., Lefkowitz R.J. et Lohse M.J. (1993). Overexpression of ß-arrestin and ß-adrenergic receptor kinase augment desensitization of ß2-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.*, **268,** 3201-3208.

Pippig S., Andexinger S. et Lohse M.J. (1995). Sequestration and recycling of ß2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.*, **47,** 666-676.

Pitcher J.A., Freedman N.J. et Lefkowitz R.J. (1998a). G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67,** 653-692.

Pitcher J.A., Hall R.A., Daaka Y., Zhang J., Ferguson S.S.G., Hester S., Miller S., Caron M.G., Lefkowitz R.J. et Barak L.S. (1998b). The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J. Biol. Chem.*, **273,** 12316-12324.

Pollock N.J., Manelli A.M., Hutchins C.W., Steffey M.E., MacKenzie R.G. et Frail D.E. (1992). Serine mutations in transmembrane V of the dopamine D1 receptor affect ligand interactions and receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **267,** 17780-17786.

Porter N.M., Radulovacki M. et Green R.D. (1988). Desensitization of adenosine and dopamine receptors in rat brain after treatment with adensoine analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244,** 218-225.

Postlethwait J.H., Yan Y.L., Gates M.A., Horne S., Amores A., Brownlie A., Donovan A., Egan E.S., Force A., Gong Z.Y., Goutel C., Fritz A., Kelsh R., Knapik E., Liao E., Paw B., Ransom D., Singer A., Thomson M., Abduljabbar T.S., Yelick P., Beier D., Joly J.S., Larhammar D., Rosa F., Westerfield M., Zon L.I., Johnson S.L. et Talbot W.S. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.*, **18,** 345-349.

Potter H. (1993). Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Method. Enzymol.*, **217,** 461-478.

Premont R.T., Jacobowitz O. et Iyengar R. (1992). Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by Gs in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Endocrinology*, **131,** 2774-2784.

Premont R.T., Koch W.J., Inglese J. et Lefkowitz R.J. (1994). Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.*, **269,** 6832-6841.

Pritchard C.A., Bolin L., Slattery R., Murray R. et Mcmahon M. (1996). Post-natal lethality and

neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr. Biol.*, **6,** 614-617.

R

Rankin M.L., Alvania R.S., Gleason E.L. et Bruch R.C. (1999). Internalization of G protein-coupled receptors in single olfactory receptor neurons. *J. Neurochem.*, **72,** 541-548.

Raposo G., Dunia I., Delavier-Klutchko C., Kaveri S., Strosberg A.D. et Benedetti E.L. (1989). Internalization of ß-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur. J. Cell Biol.*, **50,** 340-352.

Rasmussen A.S., Janke A. et Arnason U. (1998). The mitochondrial DNA molecule of the hagfish (Myxine glutinosa) and vertebrate phylogeny. *J. Mol. Evol.*, **46,** 382-388.

Rebecchi M.J. et Scarlata S. (1998). Pleckstrin homology domains: A common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biomol. Struct.*, **27,** 503.

Rocheville M., Lange D.C., Kumar U., Patel S.C., Patel R.C. et Patel Y.C. (2000a). Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, **288,** 154-157.

Rocheville M., Lange D.C., Kumar U., Sasi R., Patel R.C. et Patel Y.C. (2000b). Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.*, **275,** 7862-7869.

Rodrigues P. et Dowling J.E. (1990). Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87,** 9693-9697.

Roettger B.F., Rentsch R.U., Pinon D., Holicky E., Hadac E., Larkin J.M. et Miller L.J. (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell Biol.*, **128,** 1029-1041.

Romano C., Yang W.-L. et O'Malley K.L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.*, **271,** 28612-28616.

Roseboom P.H. et Gnegy M.E. (1989). Acute *in vivo* amphetamine produces a homologous desensitization of dopamine receptor-coupled adenylate cyclase activities and decreases agonist binding to the D1 site. *Mol. Pharmacol.*, **34,** 148-156.

S

Salim H., Ferré S., Dalal A., Peterfreund R.A., Fuxe K., Vincent J.-D. et Lledo P.-M. (2000). Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, **74,** 432-439.

Salomon Y., Londos C. et Rodbell M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.*, **58,** 541-548.

Samama P., Cotecchia S., Costa T. et Lefkowitz R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the ß2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, **268,** 4625-4636.

Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sandhya K. et Vemuri M.C. (1997). Regulation of cellular signals by G-proteins. *J. Bioscience.*, **22,** 375-397.

Saunders C., Keefer J.R., Kennedy A.P., Wells J.N. et Limbird L.E. (1996). Receptors coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins traffic to opposite surfaces in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Biol. Chem.*, **271,** 995-1002.

Saunders C. et Limbird L.E. (1997). Disruption of microtubules reveals two independent apical targeting mechanisms for G-protein-coupled receptors in polarized renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **272,** 19035-19045.

Scaife R.M. et Margolis R.L. (1997). The role of the PH domain and SH3 binding domains in dynamin function. *Cell. Signal.*, **9,** 395-401.

Schambra U.B., Duncan G.E., Breese G.R., Fornaretto M.G., Caron M.G. et Fremeau R.T., Jr. (1994). Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience*, **62,** 65-85.

Schatz G. et Dobberstein B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **271,** 1519-1526éz.

Schekman R. et Orci L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271,** 1526-1533.

Schmid S.L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process. *Annu. Rev. Biochem.*, **66,** 511-548.

Schmidt K.-F., Hruse M. et Hatt H. (1994). Dopamine alters glutamate receptor desensitization in retinal horizontal cells of the perc (*Perca fluviatilis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 8288-8291.

Schmidt U., Beyer C., Oestreicher A.B., Reisert I., Schilling K. et Pilgrim C. (1996). Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience*, **74,** 453-460.

Schnabel R., Metzger M., Jiang S., Hemmings H.C., Greengard P. et Braun K. (1997). Localization of dopamine D1 receptors and dopaminoceptive neurons in the chick forebrain. *J. Comp. Neurol.*, **388,** 146-68.

Scott K. et Zuker C. (1998). TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8,** 383-388.

Sealfon S.C. (1991). Laminar distribution of dopamine receptor subtype mRNAs in the macaque anterior cingulate cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **21,** 1347.

Seidel M.G., Klinger M., Freissmuth M. et Höleer C. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase by the A2A-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21ras-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **274,** 25833-25841.

Severynse D.M., Colapietro A.-M., Box T.L. et Caron M.G. (1995). The human D1A dopamine receptor gene promoter directs expression of a reporter gene to the central nervous system in transgenic mice. *Mol. Brain Res.*, **30,** 336-346.

Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J., GErman Z., Yuhanna I.S., Ying Y., Anderson R.G.W. et Michel T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.*, **271,** 6518-6522.

Shaw G. (1996). The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays*, **18,** 35-46.

Shih M. et Malbon C.C. (1994). Oligodeoxynucleotides antisense to mRNA encoding protein kinase A, protein kinase C, and beta-adrenergic receptor kinase reveal distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 12193-12197.

Sibley D.R., Ventura A.L.M., Jiang D. et Mak C. (1998). Regulation of the D1 dopamine receptor through cAMP-mediated pathways. *Adv. Pharmacol.*, **42,** 447-451.

Sidhu A. (1997). Regulation and expression of D-1, but not D-5, dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *J. Recept. Signal Tr. R.*, **17,** 777-784.

Sidhu A. (1998). Coupling of D-1 and D-5 dopamine receptors to multiple G proteins - Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Mol. Neurobiol.*, **16,** 125-134.

Sidhu A., Kimura K., Uh M., White B.H. et Patel S. (1998). Multiple coupling of human D5 dopamine receptors to guanine nucleotide binding proteins G(s) and G(Z). *J. Neurochem.*, **70,** 2459-2467.

Sidhu A., Sullivan M., Kohout T., Balen P. et Fishman P.H. (1991). D1 dopamine receptors can interact with both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *J. Neurochem.*, **57,** 1445-51.

Slice L.W., Yee H.F. et Walsh J.H. (1998). Visualization of internalization and recycling of the gastrin releasing peptide receptor green fluorescent protein chimera expressed in epithelial cells. *Receptor. Channel.*, **6,** 201-212.

Smiley J.F., Levey A.I., Ciliax B.J. et Goldman-Rakic P.S. (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 5720-4.

Smith D.R., Striplin C.D., Geller A.M., Mailman R.B., Drago J., Lawler C.P. et Gallagher M. (1998). Behavioural assessment of mice lacking D-1A dopamine receptors. *Neuroscience*, **86,** 135-146.

Sokoloff P., Martres M.-P. et Schwartz J.-C. (1993). La famille des récepteurs de la dopamine. *Médecine/sciences*, **9,** 12-20.

Song K.S., Li S., Okamoto T., Quilliam L.A., Sargiacomo M. et Lisanti M.P. (1996). Co-purification and direct interaction of ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.*, **271,** 9690-9697.

Spencer G.E., Klumperman J. et Syed N.I. (1998). Neurotransmitters and neurodevelopment - Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **5,** 451-467.

Spurney R.F. (1998). Effect of receptor number on desensitization of the mouse thromboxane receptor. *Biochem. Pharmacol.*, **55,** 1271-1281.

Stefan C.J., Overton M.C. et Blumer K.J. (1998). Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell*, **9,** 885-99.

Steffey M.E., Snyder G.L., Barrett R.W., Fink J.S., Ackerman M., Adams P., Bhatt R., Gomez E. et MacKenzie R.G. (1991). Dopamine D1 receptor stimulation of cyclic AMP accumulation in COS-1 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **207,** 311-317.

Storm S.M., Cleveland J.L. et Rapp U.R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*, **5,** 345-51.

Sugamori K.S., Demchyshyn L.L., Chung M. et Niznik H.B. (1994). D_{1A}, D_{1B}, and D_{1C} dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91,** 10536-10540.

Sugamori K.S., Hamadanizadeh S.A., Scheideler M.A., Hohlweg R., Vernier P. et Niznik H.B. (1998a). Functional differentiation of multiple dopamine D1-like receptors by NNC 01-0012. *J. Neurochem.*, **71,** 1685-1693.

Sugamori K.S., Scheideler M.A., Vernier P. et Niznik H.B. (1998b). Dopamine D1B receptor chimeras reveal modulation of partial agonist activity by carboxyl-terminal tail sequences. *J. Neurochem.*, **71,** 2593-2599.

Sunahara R.K., Dessauer C.W. et Gilman A.G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **36,** 461-480.

Sunahara R.K., Guan H.C., O'Dowd B.F., Seeman P., Laurier L.G., Ng G., George S.R., Torchia J., Van Tol H.H. et Niznik H.B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, **350,** 614-619.

T

Tarasova N.I., Stauber R.H., Choi J.K., Hudson E.A., Czerwinski G., Miller J.L., Pavlakis G.N., Michejda C.J. et Wank S.A. (1997). Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein - Endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A. *J. Biol. Chem.*, **272,** 14817-14824.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. et Higgins D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25,** 4876-4882.

Tiberi M. et Caron M.G. (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J. Biol. Chem.*, **269,** 27925-27931.

Tiberi M., Jarvie K.R., Silvia C., Falardeau P., Gingrich J.A., Godinot N., Bertrand L., Yang-Feng T.L., Fremeau R.T. et Caron M.G. (1991). Cloning, molecular characterization and chromosomal assignement of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88,** 7491-7495.

Tiberi M., Nash S.R., Bertrand L., Lefkovitz R.J. et Caron M.G. (1996). Differential regulation of dopamine D1A receptor responsiveness by various G protein-couped receptor kinases. *J. Biol. Chem.*, **271,** 3771-3778.

Tobin A.B. (1997). Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors. *Pharmacol. Therapeut.*, **75,** 135-151.

Tomic M., Seeman P., George S.R. et O'Dowd B.F. (1993). Dopamine D1 receptor mutagenesis: role of amino acids in agonist and antagonist binding. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **191,** 1020-1027.

Townsend-Nicholson A. (1997) Approaches to the stable transfection of G protein-coupled receptors. In: *Receptor Signal Transduction Protocols*, Volume 83, pp. 45-55.

Tsien R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **67,** 509-544.

Tsuga H., Okuno E., Kameyama K. et Haga T. (1998). Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: Effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284,** 1218-1226.

Tsukita S., Yonemura S. et Tsukita S. (1997). ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9,** 70-75.

Tsunoda S., Sierralta J. et Zuker C.S. (1998). Specificity in signaling pathways: assembly into multimolecular signaling complexes. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **8,** 419-422.

U

Undie A.S., Weinstock J., Sarau H.M. et Friedman E. (1994). Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J. Neurochem.*, **62,** 2045-2048.

V

Valdenaire O. et Vernier P. (1997). G protein coupled receptors as modules of interacting proteins: a family meeting. *Prog. Drug Res.*, **49,** 173-218.

Valiquette M., Bonin H., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J. et Bouvier M. (1990). Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human ß2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87,** 5089-5093.

Van Aelst L. et D'Souza-Schorey C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Gene Dev.*, **11,** 2295-2322.

van Biesen T., Luttrell L.M., Hawes B.E. et Lefkowitz R.J. (1996). Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.*, **17,** 698-714.

Van den Pol A.N. et Ghosh P.K. (1998). Selective neuronal expression of green fluorescent protein with cytomegalovirus promoter reveals entire neuronal arbor in transgenic mice. *J. Neurosci.*, **18,** 10640-10651.

Vernier P., Cardinaud B., Valdenaire O., Philippe H. et Vincent J.-D. (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.*, **16,** 375-381.

Vernier P., Philippe H., Samama P. et Mallet J. (1993) Bioamine receptors: evolutionary and functional variations of a structural leitmotiv. In: *Comparative Molecular Neurobiology*. Edited by Y. Pichon: Birkhäuser, pp. 297-337.

Verseaux-Botteri C., Gibert J.-M., Nguyen-Legros J. et Vernier P. (1997). Molecular identification of a dopamine D1b receptor in bovine retinal pigment epithelium. *Neurosci. Lett.*, **237,** 9-12.

Vickery R.G. et von Zastrow M. (1999). Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J. Cell Biol.*, **144,** 31-43.

Vincent S.L., Khan Y. et Benes F.M. (1995). Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse*, **19,** 112-20.

Vincent S.R., Sebben M., Dumuis A. et Bockaert J. (1998). Neurotransmitter regulation of MAP kinase signaling in striatal neurons in primary culture. *Synapse*, **29,** 29-36.

Vinos J., Jalink K., Hardy R.W., Britt S.G. et Zuker C.S. (1997). A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science*, **277,** 687-690.

Vossler M.R., Yao H., York R.D., Pan M., Rim C.S. et Stork P.J.S. (1997). cAMP activates MAP kinase

and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, **89,** 73-82.

W

Wang H.Y., Undie A.S. et Friedman E. (1995). Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol. Pharmacol.*, **48,** 988-94.

Wang J.F., Zheng J.L., Anderson J.L. et Toews M.L. (1997a). A mutation in the hamster alpha(1B)-adrenergic receptor that differentiates two steps in the pathway of receptor internalization. *Mol. Pharmacol.*, **52,** 306-313.

Wang Y., Gu Q., Mao F. et Cynader M.S. (1997b). Developmental expression and regulation of alpha1 adrenergic receptors in cultured cortical neurons. *Dev. Brain Res.*, **102,** 35-46.

Warren G. et Malhotra V. (1998). The organisation of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10,** 493-498.

Watanabe S.Y., Albsoul-Younes A.M., Kawano T., Itoh H., Kaziro Y., Nakajima S. et Nakajima Y. (1999). Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology. *Neurosci. Res.*, **33,** 71-78.

Weiss E.R., Maness P. et Lauder J.M. (1998). Why do neurotransmitters act like growth factors? *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **5,** 323-335.

Werbonat Y., Kleutges N., Jakobs K.H. et van Koppen C.J. (2000). Essential Role of Dynamin in Internalization of M2 Muscarinic Acetylcholine and Angiotensin AT1A Receptors. *J. Biol. Chem.*, **275,** 21969-21974.

Wess J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Therapeut.*, **80,** 231-264.

Wessels H.P. et Spiess M. (1988). Insertion of a multispanning membrane protein occurs sequentially and requires only one signal sequence. *Cell*, **55,** 61-70.

White J.H., Wise A., Main M.J., Green A., Fraser N.J., Disney G.H., Barnes A.A., Emson P., Foord S.M. et Marshall F.H. (1998). Heterodimerization is required for the functional GABAb receptor. *Nature*, **396,** 679-682.

Wilkie T.M., Chen Y., Gilbert D.J., Moore K.J., Yu L., Simon M.I., Copeland N.G. et Jenkins N.A. (1993). Identification, chromosomal location, and genome organization of mammalian G-protein-coupled receptors. *Genomics*, **18,** 175-84.

Wilkie T.M. et Yokoyama S. (1994). Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, **49,** 249-270.

Williams N.G., Zhong H.Y. et Minneman K.P. (1998). Differential coupling of alpha(1)-, alpha(2)-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **273,** 24624-24632.

Wirtshafter D. (1998). D-1 dopamine receptors mediate neuroleptic-induced Fos expression in the Islands of Calleja. *Synapse*, **28,** 154-159.

Wojnowski L., Stancato L.F., Zimmer A.M., Hahn H., Beck T.W., Larner A.C., Rapp U.R. et Zimmer A. (1998). Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech. Develop.*, **76,** 141-149.

Wojnowski L., Zimmer A.M., Beck T.W., Hahn H., Bernol R., Rapp V.R. et Zimmer A. (1997). Endothelial apoptosis in Braf deficient mice. *Nat. Genet.*, **16,** 293-297.

Wozniak M., Keefer J.R., Saunders C. et Limbird L.E. (1997). Differential targeting and retention of G protein-coupled receptors in polarized epithelial cells. *J. Recept. Signal Tr. R.*, **17,** 373-383.

Wozniak M. et Limbird L.E. (1996). The three alpha2-adrenergic receptor subtypes achieve basolateral localization in Madin-Darby canine kidney II cells via different targeting mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **271,** 5017-5024.

Wozniak M. et Limbird L.E. (1998). Trafficking itineraries of G protein-coupled receptors in epithelial cells do not predict receptor localization in neurons. *Brain Res.*, **780,** 311-322.

Wylie P.G., Challiss R.A.J. et Blank J.L. (1999). Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. J.*, **338,** 619-628.

Y

Yang F., Moss L.G. et Phillips G.N.J. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **14,** 1246-1251.

Yang T.T., Sinai P., Green G., Kitts P.A., Chen Y.T., Lybarger L., Chervenak R., Patterson G.H., Piston D.W. et Kain S.R. (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.*, **273,** 8212-8216.

Yeaman C., Grindstaff K.K. et Nelson W.J. (1999). New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.*, **79,** 73-98.

Yokoyama S. et Starmer W. (1992). Phylogeny and evolutionary rates of G protein alpha subunit genes. *J. Mol. Evol.*, **35,** 230-238.

Yung K.K., Bolam J.P., Smith A.D., Hersch S.M., Ciliax B.J. et Levey A.I. (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*, **65,** 709-30.

Z

Zamanillo D., Casanova E., Alonso-Llamazares A., Ovalle S., Chinchetru M.A. et Calvo P. (1995). Identification of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase phosphorylation site in the carboxy terminal tail of human D1 dopamine receptor. *Neurosci. Lett.*, **188,** 183-186.

Zapata R., Navarro A., Canela E.I., Franco R., Lluis C. et Mallol J. (1997). Regulation of L-type calcium channels in GH4 cells via A1 adenosine receptors. *J. Neurochem.*, **69,** 2546-2554.

Zernicka-Goetz M., Pines J., Hunter S.M., Dixon J.P.C., Siemering K.R., Haseloff J. et Evans M.J. (1997). Following cell fate in the living mouse embryo. *Development*, **124,** 1133-1137.

Zhang J., Barak L.S., Winkler K.E., Caron M.G. et Ferguson S.S.G. (1997). A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta(2)-adrenergic receptor resensitization - Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J. Biol. Chem.*, **272,** 27005-27014.

Zhang J., Ferguson S.S.G., Barak L.S., Ménard L. et Caron M.G. (1996). Dynamin and ß-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.*, **271,** 18302-18305.

Zhang J., Ferguson S.S.G., Law P.Y., Barak L.S. et Caron M.G. (1999). Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *J. Recept. Signal Tr. R.*, **19,** 301-313.

Zhen X.C., Uryu K., Wang H.Y. et Friedman E. (1998). D-1 dopamine receptor agonists mediate activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun amino-terminal kinase by a protein kinase A dependent mechanism in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.*, **54,** 453-458.

Zhou Q.Y., Grandy D.K., Thambi L., Kushner J.A., Van Tol H.H., Cone R., Pribnow D., Salon J., Bunzow J.R. et Civelli O. (1990). Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*, **347,** 76-80.

Zhou Q.Y., Li C. et Civelli O. (1992). Characterization of gene organization and promoter region of the rat dopamine D1 receptor gene. *J. Neurochem.*, **59,** 1875-83.

Zimmer C. (2000). Insearch of vertebrate origins: beyond brain and bone. *Science*, **287,** 1576-1579.

Zoli M., Agnati L.F., Hedlund P.B., Li X.M., Ferré S. et Fuxe K. (1993). Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells. *Mol. Neurobiol.*, **7,** 293-334.

ANNEXES

Dopamine D_1 and adenosine A_1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes

Silvia Ginés*, Joëlle Hillion†, Maria Torvinen†, Stèphane Le Crom‡, Vicent Casadó*, Enric I. Canela*, Sofia Rondin†, Jow Y. Lew§, Stanley Watson¶, Michele Zoli‖, Luigi Francesco Agnati‖, Philippe Vernier‡, Carmen Lluis*, Sergi Ferré†, Kjell Fuxe†, and Rafael Franco*††**

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; †Department of Neuroscience, Karolinska Institute, S-17177 Stockholm, Sweden; ‡Institut Alfred Fessard, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette 91198, France; §Neurochemistry Research Labs, TH-544, New York University Medical Center, New York, NY 10016; ¶Mental Health Institute, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109; ‖Department of Biomedical Sciences, University of Modena, Modena 41100, Italy; and **Department of Neurochemistry, IIBB, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 08028 Barcelona, Spain

Communicated by Tomas Hökfelt, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, May 24, 2000 (received for review December 16, 1999)

The possible molecular basis for the previously described antagonistic interactions between adenosine A_1 receptors (A_1R) and dopamine D_1 receptors (D_1R) in the brain have been studied in mouse fibroblast Ltk$^-$ cells cotransfected with human A_1R and D_1R cDNAs or with human A_1R and dopamine D_2 receptor (long-form) (D_2R) cDNAs and in cortical neurons in culture. A_1R and D_1R, but not A_1R and D_2R, were found to coimmunoprecipitate in cotransfected fibroblasts. This selective A_1R/D_1R heteromerization disappeared after pretreatment with the D_1R agonist, but not after combined pretreatment with D_1R and A_1R agonists. A high degree of A_1R and D_1R colocalization, demonstrated in double immunofluorescence experiments with confocal laser microscopy, was found in both cotransfected fibroblast cells and cortical neurons in culture. On the other hand, a low degree of A_1R and D_2R colocalization was observed in cotransfected fibroblasts. Pretreatment with the A_1R agonist caused coclustering (coaggregation) of A_1R and D_1R, which was blocked by combined pretreatment with the D_1R and A_1R agonists in both fibroblast cells and in cortical neurons in culture. Combined pretreatment with D_1R and A_1R agonists, but not with either one alone, substantially reduced the D_1R agonist-induced accumulation of cAMP. The A_1R/D_1R heteromerization may be one molecular basis for the demonstrated antagonistic modulation of A_1R of D_1R receptor signaling in the brain. The persistence of A_1R/D_1R heteromerization seems to be essential for the blockade of A_1R agonist-induced A_1R/D_1R coclustering and for the desensitization of the D_1R agonist-induced cAMP accumulation seen on combined pretreatment with D_1R and A_1R agonists, which indicates a potential role of A_1R/D_1R heteromers also in desensitization mechanisms and receptor trafficking.

During the 1980s, indications for the existence of intramembrane interactions between different G protein-coupled receptors, mainly between neuropeptide and monoamine receptors, were obtained in several brain areas (1, 2). It was later proposed that a possible molecular mechanism for this phenomenon was receptor heteromerization (3) and direct evidence for homo- and heteromerization of G protein-coupled receptors has been obtained by several groups. It was first shown that serotonin 5-HT-1B receptors exist as monomers and dimers (4). This was followed by demonstration of dimers and oligomers of dopamine D_1 and D_2 receptors (D_1 and D_2R) in transfected Sf cells (5–7) and of adenosine A_1 receptors (A_1Rs) in a natural cell line and in mammalian brain (8). It has recently been reported that a fully functional γ-aminobutyric acid (GABA) type B receptor demands the heterodimerization of $GABA_BR1$ and $GABA_BR2$ receptors (9–12). Moreover, two functional opioid receptors, the κ and δ subtypes, can undergo heteromerization, which changes the pharmacology of the individual receptors and potentiates signal transduction (13). Finally, D_2R and somatostatin receptor subtype 5 have been shown to physically interact by forming heterooligomers with enhanced functional activity (14). Direct protein–protein coupling can also exist between G protein-coupled anion channel receptors, as recently shown for dopamine D5 receptor and $GABA_A$ receptor, making possible bilateral inhibitory interactions between these receptors (15).

Antagonistic adenosine/dopamine interactions have been widely reported in the central nervous system in behavioral and biochemical studies. Furthermore, in animal models, adenosine agonists and antagonists are potent atypical neuroleptics and antiparkinsonian drugs, respectively (16–18). Thus, adenosine agonists inhibit and adenosine antagonists, such as caffeine, potentiate the behavioral effects induced by dopamine agonists. The evidence suggests that this antagonism is at least in part caused by an intramembrane interaction between specific subtypes of dopamine and adenosine receptors, namely, between A_1Rs and D_1Rs and between adenosine A_{2A} receptors ($A_{2A}Rs$) and D_2Rs (16). This antagonism is evident in crude membrane preparations from cell lines expressing the two receptors and from rat striatum in which, for instance, activation of A_1Rs reduces the proportion of D_1Rs in the high-affinity state without changing the dissociation constants of the high- and the low-affinity binding sites (19, 20). In the present paper, indications have been obtained that the postulated intramembrane interactions between A_1Rs and D_1Rs may involve the formation of heteromeric complexes regulated by A_1R and D_1R agonists.

Methods

Cell Cultures. Previously characterized mouse fibroblast Ltk$^-$ cells transfected with human D_1R cDNA (D_1 cells) and with both human D_1R and human A_1R cDNAs (A_1/D_1 cells) were used (20). For control experiments, Ltk$^-$ cells cotransfected with human D_2R (long-form) and human A_1R cDNAs (A_1/D_2 cells) were obtained with the calcium phosphate precipitation method (20). Ltk$^-$ cells were grown as described (20). Primary cultures of neurons were obtained from 17- to 18-day-old Sprague–Dawley rat embryos as described (21).

Radioligand-Binding Experiments. Membrane preparations from Ltk$^-$ cells were obtained as described (20). Saturation experiments with the D_2R antagonist [^{3}H]raclopride (79.3 Ci/mmol; NEN; 1 Ci = 37 GBq) and the ^{3}H-labeled A_1R antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine ([^{3}H]DPCPX; 120 Ci/mmol; NEN) and competition experiments of [^{3}H]raclopride versus dopamine (in the presence and absence of the selective A_1R agonist N^6-cyclopentyladenosine (CPA; 10 nM) were performed

Abbreviations: A_1R, adenosine A_1 receptor; D_1R, dopamine D_1 receptor; D_2R, dopamine D_2 receptor; *R*-PIA, (*R*)-(−)N^6-(2-phenylisopropyl)adenosine.

††To whom reprint requests should be addressed. E-mail: r.franco@sun.bq.ub.es.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Article published online before print: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.150241097. Article and publication date are at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.150241097

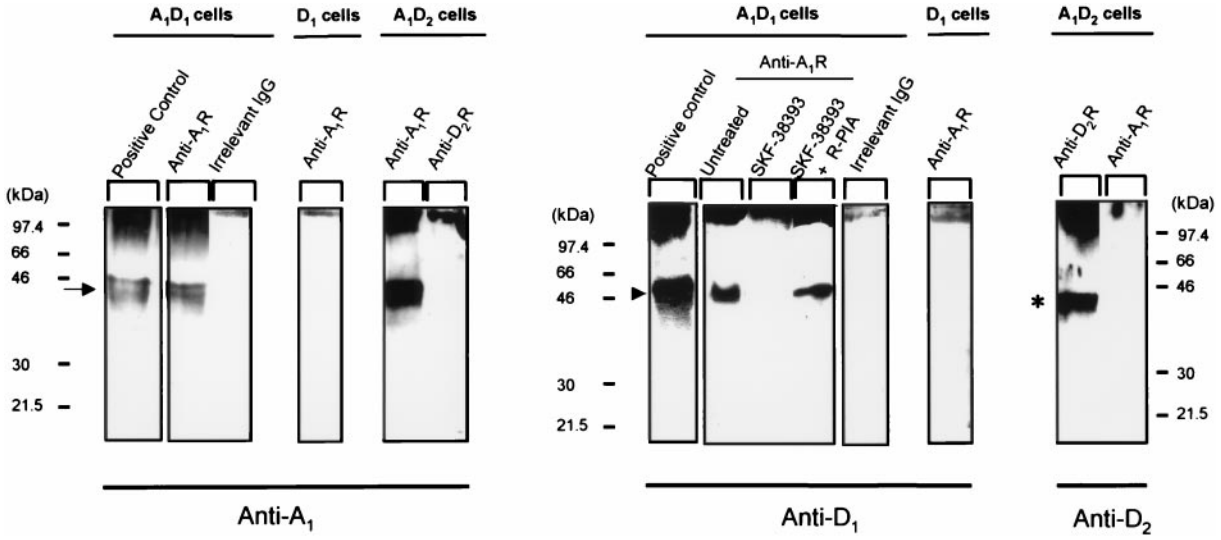


Fig. 1. Coimmunoprecipitation of A_1R and D_1R. Cell membranes from A_1/D_1, A_1/D_2, or D_1 cells were obtained and processed for immunoprecipitation (see *Methods*) by using the purified anti-A_1R antibody PC11, the anti-D_2R antibody, or an irrelevant goat IgG; all were covalently coupled to protein A-Sepharose. Immunoblottings of cell lysates (positive control) and immunoprecipitates were performed to detect A_1R with anti-A_1R antibody, D_1R with anti-D_1R antibody, or D_2R with anti-D_2R antibody. When indicated, A_1/D_1-cotransfected cells were incubated for 1 h with 10 μM SKF-38393 in the absence or presence of 100 nM *R*-PIA. The arrow indicates the band for A_1R, the arrowhead the band corresponding to D_1R, and the asterisk the band for D_2R.

as described (20, 22). Data from saturation experiments were analyzed by nonlinear regression analysis (GRAPHPAD) for the determination of dissociation constants (K_d) and the total number of receptors (B_{max}). Data from competition experiments were also analyzed by nonlinear regression analysis, and the dissociation constants for the high-affinity (K_H) and low-affinity (K_L) binding sites and the proportion of binding sites in the high-affinity state (R_H) were determined. The amount of nonspecific binding was calculated by extrapolation of the displacement curve. Protein determinations were performed by using BSA as a standard. The Mann–Whitney *U* test was used to analyze differences in R_H, K_H, and K_L values.

cAMP Determination. Treatments were performed for 30, 60, and 120 min with 10 μM ($\pm$)-SKF-38393 (Research Biochemicals, Natick, MA) and/or 100 nM (*R*)-($-$)N^6-(2-phenylisopropyl)adenosine (*R*-PIA, Research Biochemicals). After two washes at 4°C with culture medium containing the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma), cAMP accumulation was induced by stimulating D_1Rs for 15 min with 10 μM SKF-38393. The reaction was stopped by adding HCl (0.1 M final concentration) and cAMP was extracted from cells and quantified according to Nordstedt and Fredholm (23). Absolute values were used in the statistical analysis by means of repeated measures ANOVA with post hoc Scheffe's test.

Double-Immunolabeling Experiments. For immunofluorescence staining, cells (A_1/D_1 or A_1/D_2 cells, or primary cultures of cortical neurons) growing on glass coverslips were incubated in the absence or presence of 100 nM *R*-PIA, 10 μM SKF-38393, or 100 nM *R*-PIA plus 10 μM SKF-38393 in serum-free medium for 1 h at 37°C. They were then rinsed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, and washed in PBS containing 20 mM glycine. Cells were permeabilized for 7 min with 0.01% saponin (A_1/D_1 and A_1/D_2 cells) or 0.2% Triton X-100 (cortical neurons) in PBS and subsequently treated with PBS/20 mM glycine/1% BSA for 30 min at room temperature. Double immunostaining was performed with fluorescein-conjugated anti-A_1R antibody (PC21-FITC, 20 μg/ml for transfected cells or 50 μg/ml for cortical neurons) (8, 24) and Texas red-conjugated anti-D_1R (D_1–356-446-Tx, 5 μg/ml for transfected cells or 10 μg/ml for cortical neurons) (25) or Texas red-conjugated anti-D_2R (D_2–246-316-Tx) (25) for 1 h at 37°C. The coverslips were rinsed for 40 min in the same buffer and mounted with medium for immunofluorescence (ICN). Confocal microscopic observations were made with a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) confocal scanning laser equipment adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope. The extent of colocalization of the two labelings was assessed by means of computerized image analysis (KS300, Kontron, Zurich). A couple of images of the same field stained with the two labelings were analyzed at each time. In each image, the specific staining was discriminated from the nonspecific background by means of the threshold function and the discriminated images of the two labelings were superimposed and subtracted by means of the AND Boolean operator function. By using this function, a new image is created containing only pixels that are positive in both original discriminated images. The percent coexistence is obtained by expressing the number of positive pixels in the new image in percent of the number of positive pixels in each of the original discriminated images.

Immunoprecipitation of A_1R, D_1R, and D_2R. A_1/D_1 cotransfected cells were incubated in the absence or presence of 100 nM *R*-PIA or 10 μM SKF-38393 in serum-free medium for 1 h at 37°C. Cell membranes were obtained by centrifugation (105,000 $\times$ *g* for 45 min at 4°C) after disruption of cells with a Polytron homogenizer (Kinematica, PTA 20TS rotor, setting 4; Brinkmann) for three 5-s periods in 50 mM Tris·HCl, pH 7.4. Membranes were separated at 105,000 $\times$ *g* (45 min at 4°C). Pretreated or control membranes were solubilized in ice-cold lysis buffer (PBS, pH 7.4/1% Nonidet P-40/0.5% sodium deoxycholate/0.1% SDS) for 1 h on ice and then centrifuged at 80,000 $\times$ *g* for 90 min. The supernatants (1 mg of protein per ml) were precleared by incubation (6 h) with staphylococcal protein A-Sepharose beads. After centrifugation at 10,000 $\times$ *g* for 15 s, the supernatants were transferred to a tube containing affinity-purified anti-A_1R antibody (PC11) (8) or a control rabbit IgG, both antibodies covalently coupled to protein A-Sepharose (24). Nonspecific immunoprecipitation was performed by incubating the same

NEUROBIOLOGY

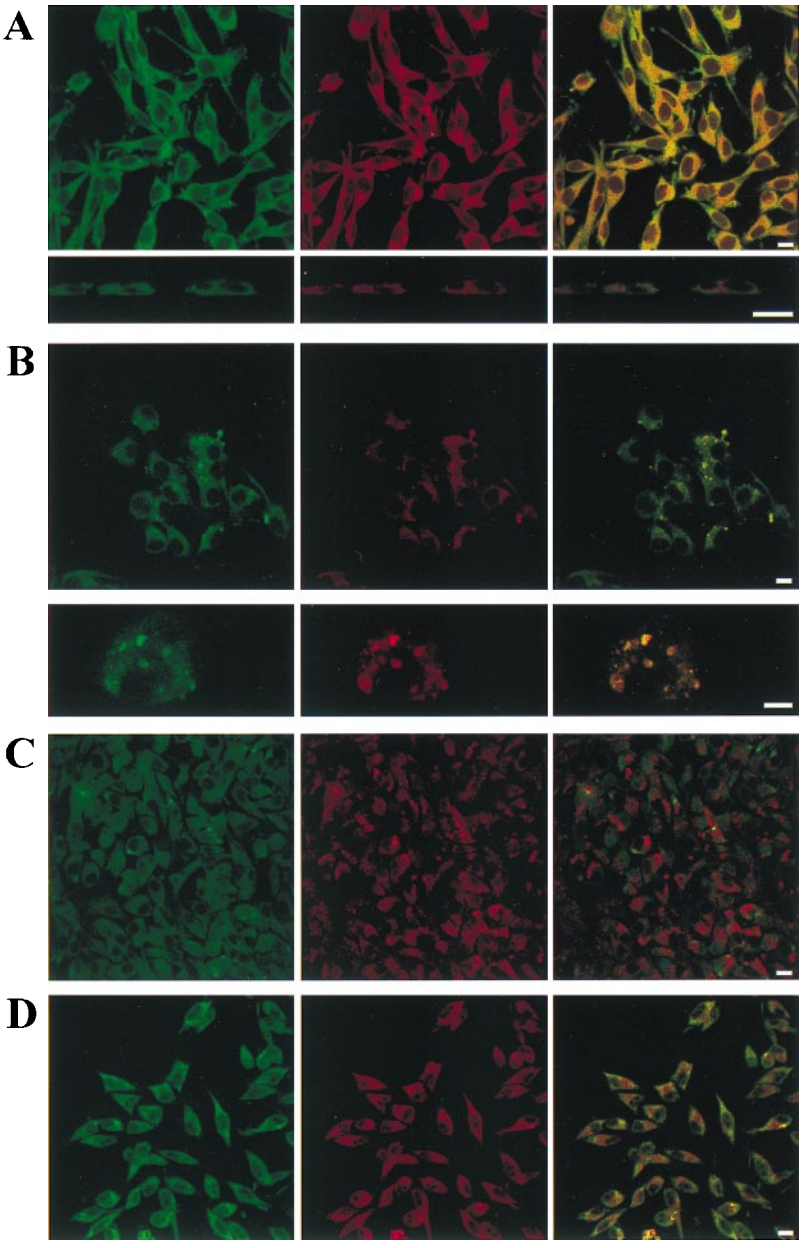


Fig. 2. Distribution of A_1R and D_1R in A_1/D_1-cotransfected fibroblast cells. Cells were incubated for 1 h with medium in the absence (*A*) or presence of 100 nM *R*-PIA (*B*), 10 μM SKF-38393 (*C*), or 100 nM *R*-PIA plus 10 μM SKF-38393 (*D*) and were processed for immunostaining (see *Methods*) by using fluorescein (green)-conjugated rabbit anti-A_1R antibody and a Texas red-conjugated rabbit anti-D_1R antibody. The cells were analyzed by confocal laser microscopy. Superimposition of images (*Right* images in each panel) reveals the colocalization of A_1R and D_1R in yellow. (*A Lower*) A vertical section of representative cells is also shown. (*B Lower*) A magnification of a representative cell is also given. (Scale bars: 10 μm.)

amount of protein A-Sepharose coupled to anti-A_1R antibody with membrane extracts (obtained as described above) from D_1 cells, which do not express A_1R. Immunoprecipitates were washed twice in ice-cold lysis buffer containing 0.1% Nonidet P-40/0.05% sodium deoxycholate/0.01% SDS and once in ice-cold PBS, pH 7.4. After centrifugation and isolation of the beads, 60 μl of SDS/PAGE sample buffer was added to the beads. Immune complexes treated at 37°C for 15 min were resolved by SDS/PAGE in 12.5% gels. Proteins were transferred to poly-(vinylidene difluoride) (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore) for 1 h by using a wet transfer system in Towbin buffer (25 mM Tris/192 mM glycine/20% methanol, pH 8.3). Nonspecific protein binding sites on the PVDF membranes were blocked by incubation overnight at 4°C by using 10% (wt/vol) dehydrated milk in PBS. After blocking, PVDF membranes were washed three times (10 min per wash) in 10 mM Tris·HCl buffer containing 500 mM NaCl and 0.5% Tween-20 (TBS-TII; pH 7.4) and incubated for 2 h with the purified anti-A_1R antibody (PC11; 10 μg/ml), purified anti-D_1R antibody (D_1–356-446; 10 μg/ml), or purified anti-D_2R antibody (D_2–246-316; 10 μg/ml) in TBS-TII, including 0.02% NaN_3. Immunoreactive bands were detected with a donkey anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1/10,000 Promega W401 B 8846301), followed by development with a chemiluminescence detection system (Pierce SuperSignal). A similar protocol was used to study possible coimmunoprecipitation of A_1R and D_2R, by using an anti-D_2R antibody (25) for immunoprecipitation and immunoblotting in membranes from A_1/D_2 cells.

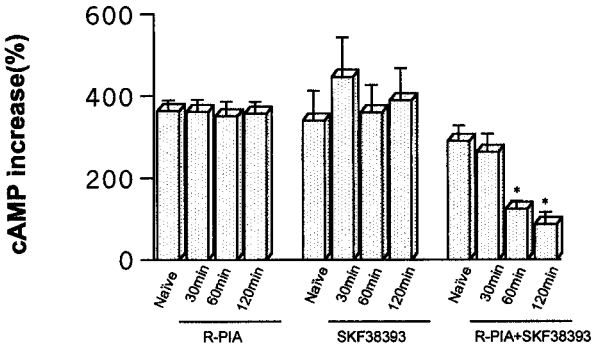


Fig. 3. cAMP accumulation induced by incubation with 10 μM SKF-38393 (15 min) after pretreatment of A_1/D_1-cotransfected cells with 100 nM *R*-PIA and/or 10 μM SKF-38393. Control cells (naive) were treated with medium alone for 120 min. Data represent the means ± SEM ($n = 6$) of the percentage of increase versus basal values. The basal values of cAMP for the groups treated with *R*-PIA, SKF-38393, and *R*-PIA plus SKF-38393 were (means ± SEM, in pmol/mg of protein; $n = 4$) 11,020 ± 1,345; 24,060 ± 2,279; and 14,030 ± 1,375; respectively. Repeated measures ANOVA with post hoc Scheffé's test: *, $P < 0.01$ with respect to control cells (not significantly different from basal values).

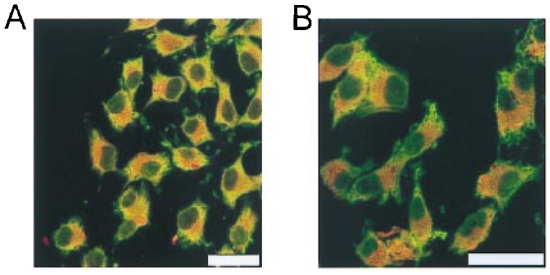


Fig. 4. Distribution of A_1R and D_2R in A_1/D_2-cotransfected fibroblast cells. Cells were processed for immunostaining (see *Methods*) by using fluorescein (green)-conjugated rabbit anti-A_1R antibody and a Texas red-conjugated rabbit anti-D_2R antibody. The cells were analyzed by confocal laser microscopy. (*B*) Cells were treated with 100 nM *R*-PIA. Superimposition of images reveals the lack colocalization of A_1R and D_2R. (Scale bars: 10 μm.)

Results

Studies on A_1R- and D_1R-Containing Fibroblast Cells. *Immunoprecipitation experiments.* As seen in Fig. 1, the A_1R antibody immunoprecipitated a band in A_1/D_1 cells with a molecular mass of 46 kDa, which was detected by a specific antibody for human D_1R. This band did not appear when an irrelevant antibody was used or when D_1 cells (transfected with D_1R cDNA alone) were analyzed (Fig. 1). Immunoblottings of cell lysates were used as positive controls. Treatment of the A_1/D_1 cells with 10 μM of the D_1R agonist SKF-38393 for 1 h reduced the intensity of the 46-kDa band detected by the anti-D_1R antibody. This action of SKF-39393 was no longer seen after combined treatment with SKF-38393 (10 μM; 1 h) and the A_1R agonist *R*-PIA (100 nM, 1 h) (Fig. 1).

Double-immunolabeling experiments. The degree of D_1R immunoreactivity was similar in D_1 cells and A_1/D_1 cells. The antibody against the A_1R labeled A_1/D_1 cells but not D_1 cells. With the confocal laser microscopy, it was possible to see a homogenous distribution of A_1Rs and D_1Rs on the cell surface of A_1D_1 cells. The analysis of these cells showed a marked overlap in the distribution of the two receptor proteins. The percentage of colocalization was 71% for the A_1R immunoreactive area and 77% for the D_1 immunoreactive area in the absence of agonists. The vertical optical sections demonstrated that the colocalization of A_1R and D_1R exists both in the cell membrane and in the cytoplasm (Fig. 2*A*). When the cells were treated for 1 h with the A_1R agonist *R*-PIA, a redistribution of A_1Rs and D_1Rs was observed (Fig. 2*B*). Thus, *R*-PIA induced the aggregation of both proteins in clusters seen as punctate fluorescence, where colocalizations between adenosine and dopamine receptors approach 100% (see the intensity of yellow in Fig. 2*B*). In contrast, the D_1R agonist SKF-38393 clustered D_1Rs but not A_1Rs (Fig. 2*C*). The *R*-PIA- or SKF-38393-induced clusters had a similar appearance; the clusters were very variable in size with no preferential localization within the cell. Furthermore, combined treatment with SKF-38393 and *R*-PIA as above did not result in any clustering either of the D_1R or the A_1R (Fig. 2*D*).

cAMP determination. In A_1/D_1 fibroblast cells, pretreatment with the D_1R agonist SKF-38393 (10 μM) for 30–120 min did not alter the SKF-38393-induced increase in cAMP accumulation (Fig. 3). The same was also true after pretreatment with 100 nM of *R*-PIA for 30–120 min. In contrast, a significant reduction of the SKF-38393-induced cAMP accumulation was found after combined pretreatment with SKF-38393 (10 μM) and *R*-PIA (100 nM) for 60 and 120 min (Fig. 3).

Studies on A_1R- and D_2R-Containing Fibroblast Cells. *Radioligand-binding experiments.* The clone chosen for subsequent studies had a high density of A_1R labeled with 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine ([^{3}H]DPCPX) (means ± SEM; B_{max}, 4.4 ± 0. 1 pmol/mg of protein; K_d, 4.6 ± 0.4 nM; $n = 4$) and D_2R labeled with [^{3}H]raclopride (means ± SEM; B_{max}, 0.9 ± 0.06 pmol/mg of protein; K_d, 5.7 ± 0.9 nM; $n = 4$). In competition experiments with [^{3}H]raclopride versus dopamine, K_H, K_L, and R_H values (medians, and in parentheses, interquartile ranges) were 0.07 (0.1) μM, 1.9 (0.5) μM, and 28.3 (15.3)% ($n = 4$), respectively. The A_1 agonist N^6-cyclopentyladenosine (10 nM) failed to significantly influence these values, being 0.09 (0.2) μM, 2.5 (1.4) μM, and 27.5 (16.8)% ($n = 4$), respectively.

Immunoprecipitation experiments. As seen in Fig. 1, A_1R antibodies could not detect immunocomplexes precipitated by D_2R antibodies and D_2R antibodies could not detect immunocomplexes precipitated by A_1R antibodies.

Double-immunolabelling experiments. D_2R immunoreactivity and A_1R immunoreactivity was demonstrated in the A_1/D_2 cells but a low colocalization could be seen in the absence (Fig. 4*A*) or presence (Fig. 4*B*) of *R*-PIA.

Studies on Primary Rat Cortical Cultures. As seen in Fig. 5, the cultured neurons showed A_1R and D_1R immunoreactivity. The location of both receptors was diffuse in the soma and dendrites with a high degree of colocalization (Fig. 5*A*). The degree of colocalization between A_1R and D_1R immunoreactivity was similar to that found in cotransfected fibroblast cells. The A_1R agonist *R*-PIA reproduced the clustering effect on D_1Rs and A_1Rs observed in the cotransfected fibroblast cells (Fig. 5*B*). In these cultures, also SKF-38393 (10 μM, 1 h) produced clustering with a high degree of colocalization of D_1Rs and A_1Rs (Fig. 5*C*). The simultaneous treatment with SKF-38393 (10 μM) and *R*-PIA (100 nM) for 1 h instead blocked the formation of the A_1R/D_1R clusters seen with either of the agonists alone (Fig. 5*D*).

Discussion

The existence of homo- and/or heteromers of G protein-coupled receptors has recently been proposed and experimental evidence for this concept is starting to be obtained (see Introduction). In the present paper, it is shown that D_1Rs and A_1Rs form heteromeric complexes under basal conditions and that they can coaggregate (cocluster) under some specific agonist-stimulated conditions. The two phenomena appear to be related to each

NEUROBIOLOGY

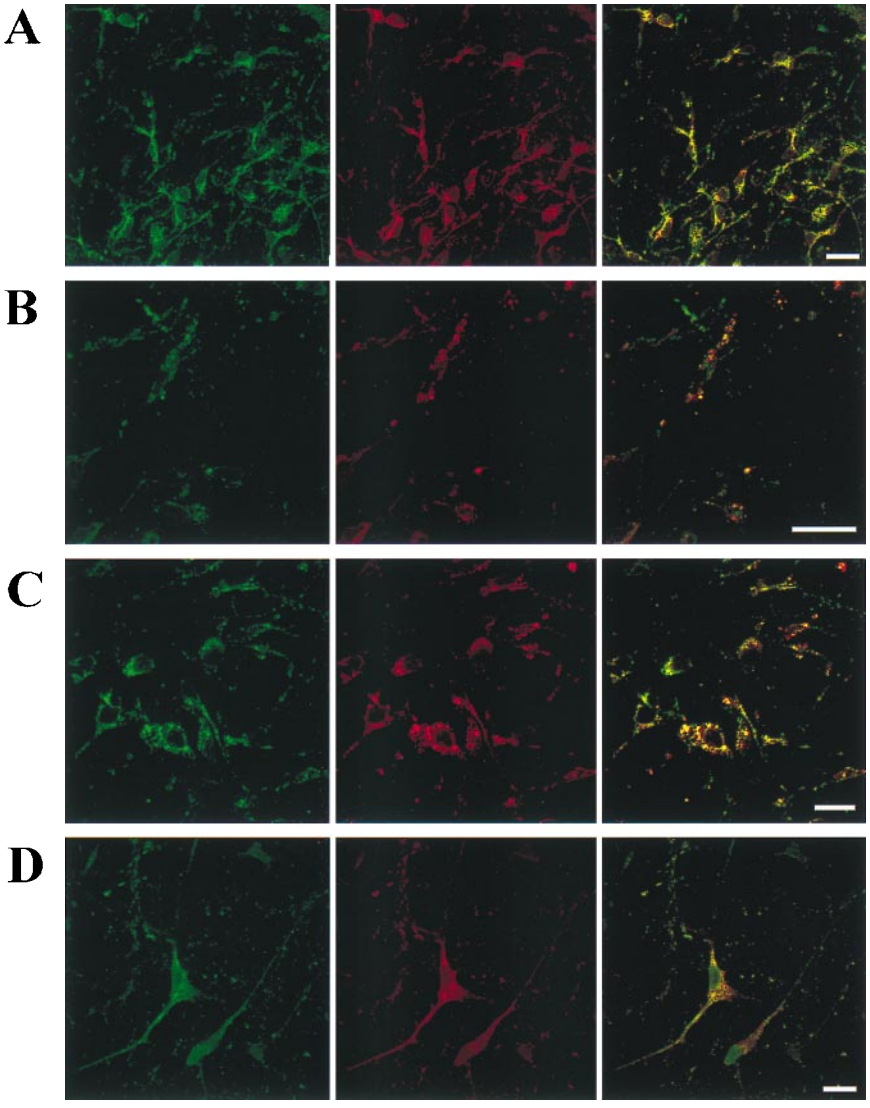


Fig. 5. Distribution of A_1R and D_1R in primary cultures of cortical neurons. Cells were incubated for 1 h with medium in the absence (*A*) or presence of 100 nM *R*-PIA (*B*), 10 μM SKF-38393 (*C*), or 100 nM *R*-PIA plus 10 μM SKF-38393 (*D*) and were processed for immunostaining (see *Methods*) by using fluorescein (green)-conjugated rabbit anti-A_1R antibody and a Texas red-conjugated rabbit anti-D_1R antibody. The cells were analyzed by confocal microscopy. Superimposition of images (*Right* images in each panel) reveals the colocalization of A_1R and D_1R in yellow. (Scale bars: 10 μm.)

other in a complex way and may have different functional meaning.

The existence of A_1R/D_1R heteromers was tested in immunoprecipitation experiments by using membranes from rat fibroblast cells cotransfected with the cDNAs for human D_1Rs and A_1Rs (20). The antibody against A_1R was able to coimmunoprecipitate the D_1R in A_1/D_1 cells but not D_2R in A_1/D_2 cells. These results are of importance, because they indicate that after solubilization, the adjacent A_1R/D_1R do not become associated in a nonspecific way. Accordingly, the A_1R agonist N^6-cyclopentyladenosine, which modulates D_1R binding (19, 20), did not significantly change the binding parameters obtained from competitive inhibition curves of dopamine versus [^{3}H]raclopride in A_1/D_2 cells. Overall, these results indicate that the A_1Rs and D_1Rs are physically associated, directly or indirectly via an additional component, in cells coexpressing both receptors and that these heteromeric complexes exist in the absence of receptor activation by exogenous agonists.

In cotransfected Ltk$^-$ fibroblast cells, 1 h of exposure to A_1R and D_1R agonists, alone or in combination, had remarkable effects on hetero- or homomerization, and on the degree of aggregation of A_1Rs and D_1Rs. Exposure to the A_1R agonist *R*-PIA induced the formation of clusters (aggregations) containing both A_1R and D_1R immunoreactivities. In contrast, the D_1R agonist SKF-38393 decreased the amount of A_1R/D_1R heteromers, and induced selective clustering of D_1Rs. Different from each single treatment, 1-h exposure with both A_1R and D_1R agonists maintained the heteromeric association of the two receptors but decreased the amount of A_1R/D_1R aggregations (clusters).

D_1R agonist-induced cAMP accumulation, a main index of D_1R function, was studied after the same pretreatment conditions as described above in cotransfected Ltk$^-$ fibroblast cells. It was found that nonclustered D_1R (naive cells), clustered D_1R (D_1R agonist treatment), or clustered A_1R/D_1R (A_1R agonist treatment) all cause a similar cAMP response to the D_1R agonist challenge. Thus, clustering *per se* is not a prerequisite for D_1R coupling to adenylate cyclase, nor does it appear to modulate D_1R function. On the other hand, a clear-cut decrease in D_1R signaling to adenylate cyclase was found when the A_1/D_1 cells were pretreated simultaneously with the A_1R and D_1R agonists.

Notably, after A_1R/D_1R coactivation, the two receptors remain physically associated, but differently from the effect of A_1R activation alone, do not form clusters. These data show that A_1R activation influences the D_1Rs, which are and remain physically associated in a heteromeric complex, and leads to an uncoupling of D_1R from adenylyl cyclase only when the D_1Rs are simultaneously activated. Thus, the temporal dynamics of receptor activation and heteromerization may play a key role in A_1R/D_1R interactions. The uncoupling of D_1R and Gs occurring in coactivated A_1R/D_1R heteromers may contribute to adenosine inhibition of D_1R function, and complement the known A_1R-induced inhibition of D_1R function mediated by the activation of Gi (19, 20). Overall, A_1R- and D_1R-mediated transmission, heteromerization, and clustering are phenomena related to each other in a complex manner. Homogeneous or heterogeneous clustering does not appear to be a necessary consequence of receptor activation but it may be a prerequisite for internalization (26). On the other hand, the mono-, homo-, or heteromeric state of A_1R and D_1R is not related in an obvious way to receptor clustering. In fact, the role of homo- and heteromerization may be different in different systems (9–12, 27).

The colocalization of D_1Rs and A_1Rs as well as their clustering in response to A_1 and/or D_1 agonist treatment as described above was also analyzed in primary cultures of neurons from rat cerebral cortex. A_1Rs and D_1Rs were highly colocalized and diffusely distributed to the soma and dendrites of the cortical neurons, which is consistent with previous studies that identified D_1Rs and A_1Rs in cell bodies, dendrites, and spines mainly at extrasynaptic locations (28, 29). The A_1R agonist *R*-PIA reproduced in neurons the effects already observed in cotransfected fibroblast cells, i.e., increases in A_1R/D_1R colocalization up to 100% and coaggregation in clusters. In contrast to the A_1R/D_1R-cotransfected fibroblast cells, the effect of SKF-38393 in neurons was similar to that of *R*-PIA, namely a coclustering of D_1Rs and A_1Rs. These differential actions may reflect differences in the relative amount of the receptors in the A_1R/D_1R complexes in the neurons as compared with cotransfected fibroblasts. In addition, the neurons may have membrane components that the A_1R/D_1R-cotransfected cells do not express, leading to the coclustering of A_1R/D_1R also after the D_1R agonist pretreatment. Nevertheless, the simultaneous pretreatment of neurons with the D_1R and the A_1R agonists reproduced the results obtained in A_1R/D_1R-cotransfected cells with failure to cluster either one of the receptors.

Based on immunoprecipitation and double immunolabeling experiments, evidence is presented for the existence of A_1R and D_1R heteromers, and their presence in membranes of cotransfected fibroblast cells. Functional experiments on the D_1R agonist-induced cAMP production suggest that coactivation of A_1R and D_1R in the heteromeric complex leads to an uncoupling of D_1R from Gi. This antagonistic mechanism may contribute to the A_1R/D_1R functional antagonism found in the brain and offers a basis for the design of novel agents to treat Parkinson's disease and neuropsychiatric disorders, based on the pharmacological properties of the A_1/D_1 heteromeric complex.

This work was supported by the Spanish Commission of Science and Technology (PB97–0984, BIO099–0601-C02–02), a coordinated European BIOMED 2 program (BM4-CT96–0238), an Italian MPI ex60597 grant, the Swedish Medical Research Council, and the Marianne and Marcus Wallenberg Foundation.

1. Agnati, L. F., Fuxe, K., Benfenati, F., Celani, M. F., Battistini, N., Mutt, V., Cavicchioli, L., Galli, G. & Hokfelt, T. (1983) *Neurosci. Lett.* **35,** 179–183.
2. Fuxe, K. & Agnati, L. F., eds. (1987) *Receptor-Receptor Interactions.* Wenner-Gren Center Interactional Symposium Series (Macmillan, New York).
3. Zoli, M., Agnati, L. F., Hedlund, P. B., Li, X. M., Ferré, S. & Fuxe, K. (1993) *Mol. Neurobiol.* **7,** 293–334.
4. Ng, G. Y., George, S. R., Zastawny, R. L., Caron, M., Bouvier, M., Dennis, M. & O'Dowd, B. F. (1993) *Biochemistry* **32,** 11727–11733.
5. Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Caron, M., Dennis, M., Brann, M. R. & George, S. R. (1994) *J. Neurochem.* **63,** 1589–1595.
6. Ng, G. Y., Mouillac, B., George, S. R., Caron, M., Dennis, M., Bouvier, M. & O'Dowd, B. F. (1994) *Eur. J. Pharmacol.* **247,** 7–19.
7. Ng, G. Y., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, S., Seeman, P. & George, S. R. (1996) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **227,** 200–204.
8. Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluis, C. & Franco, R. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42,** 818–828.
9. Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W. J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L. Y., *et al.* (1998) *Nature (London)* **396,** 674–679.
10. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. & Marshall, F. H. (1998) *Nature (London)* **396,** 679–682.
11. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl. W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., *et al.* (1998) *Nature (London)* **396,** 683–688.
12. Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Bach, A. & Kornau, H. C. (1999) *Science* **283,** 74–77.
13. Jordan, B. A. & Devi, L. A. (1999) *Nature (London)* **399,** 697–700.
14. Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C. & Patel, Y. C. (2000) *Science* **288,** 154–157.
15. Liu, F., Wan, Q. I., Pristupa, Z. B., Yu, X.-M., Wang, Y. T. & Niznik, H. B. (2000) *Nature (London)* **403,** 274–280.
16. Ferré, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P. & Fuxe, K. (1997) *Trends Neurosci.* **20,** 482–487.
17. Rimondini, R., Ferré, S., Ogren, S. O. & Fuxe, K. (1997) *Neuropsychopharmacology* **17,** 82–91.
18. Kanda, T., Jackson, M. J., Smith, L. A., Pearce, R. K., Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y. & Jenner, P. (1998) *Ann. Neurol.* **43,** 507–513.
19. Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Finnman, U.-B., Martínez, E., Scotti de Carolis, A. & Fuxe, K. (1994) *NeuroReport* **6,** 73–76.
20. Ferré, S., Torvinen, M., Antoniou, K., Irenius, E., Civelli, O., Arenas, E., Fredholm, B. B. & Fuxe, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 4718–4724.
21. Villalba, M., Martínez-Serrano, A., Gómez-Puertas, P., Blanco, P., Börner, C., Villa, A., Casado, M., Jiménez, E., Pereira, R., Bogonez, E., *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **244,** 2468–2476.
22. Kull, B., Ferré, S., Arslan, G., Svenningsson, P., Fuxe, K., Owman, C. & Fredholm, B. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **58,** 1035–1045.
23. Nordstedt, C. & Fredholm, B. B. (1990) *Anal. Biochem.* **189,** 231–234.
24. Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U. & Greaves, M. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257,** 10766–10769.
25. Bjelke, B., Goldstein, M., Tinner, B., Andersson, C., Sesack, S. R., Steinbusch, H. W., Lew, J. Y., He, X., Watson, S., Tengroth, B., *et al.* (1996) *J. Chem. Neuroanat.* **12,** 37–50.
26. Saura, C. A., Mallol, J., Canela, E. I., Lluis, C. & Franco, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 17610–17617.
27. Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C. & Bouvier, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271,** 16384–16392.
28. Caille, I., Dumartin, B. & Bloch, B. (1996) *Brain Res.* **730,** 17–31.
29. Rivkees, S. A., Price, S. L. & Zhou, F. C. (1995) *Brain Res.* **677,** 193–203.

Desensitisation Functionally Differentiates between D_{1A}, D_{1B} and D_{1C} Dopamine Receptor Subtypes

LE CROM Stéphane[1], PRISTUPA, Zdenek B.[2], NIZNIK, Hyman B.[2] and VERNIER Philippe[1]

1) Développement, Evolution, Plasticité du Système Nerveux UPR2197, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, Gif-sur-Yvette, 91198, France

2) Laboratory of Molecular Neurobiology, Center For Addiction and Mental Health, Toronto, Ontario M5T 1R8, Canada

Corresponding Author:

Dr. Philippe VERNIER

Développement, Evolution, Plasticité du Système Nerveux – UPR 2197

Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – CNRS

Avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette France

Phone: 33.1.69.82.34.30

Fax: 33.1.69.07.05.38

E-Mail: vernier@iaf.cnrs-gif.fr

Running Title:

Compared desensitisation of D_1 dopamine receptors

Summary

Three subtypes of dopamine D_1 receptors exist in most groups of vertebrates except mammals. Each of these subtypes is characterised by a small number of functional properties that have been fixed early during vertebrate evolution. Here, the desensitisation properties of the three vertebrate D_1 receptor subtypes were systematically compared. As measured by cAMP accumulation, D_{1A} receptor displayed biphasic desensitisation, with a 50% decrease in the first 5 minutes, a short rebound and a further decrease reaching 75%. D_{1B} had a similar profile, with a smaller amplitude, consistent with its constitutive activity. In contrast, D_{1C} receptor did not undergo desensitisation, even after 12 hours of agonist exposure. The desensitisation characteristics depended on neither cell type nor adenylate cyclase regulation. D_1 receptor chimaeras showed that the C-terminus was largely responsible for the desensitisation peculiarities of each subtype. D_1 receptors fused with GFP revealed that the fast decline in receptor activity was not accompanied by detectable changes in cell labelling, except for a late and incomplete disappearance of the fluorescence at the plasma membrane, proportional to desensitisation of each subtype. Thus, desensitisation is a major functional character that discriminates between the D_1 receptor subtypes and that has been conserved during vertebrate evolution.

Introduction

The diversity of physiological responses to dopamine in the vertebrate nervous system depends on a multiplicity of receptor subtypes and on their distribution on target cells. Based on structure and function, dopamine receptors can be divided, into two classes, D_1 and D_2 receptors, both belonging to the G protein-coupled receptor superfamily. Three subtypes of D_1 receptor (D_{1A}, D_{1B} and D_{1C}) are present in most groups of jawed vertebrates, except mammals in which only D_{1A} (also called D_1) and D_{1B} (also called D_5) receptors have been identified (1,2). However, dopamine effects cannot be reduced to the expression of a given receptor subtype in certain cells. For D_1 receptors, diverse and contradictory profiles of cell activation by various dopamine agonists have been described in natural situations and in heterologous cells (3,4). This accounts for the contingent acquisition by the receptor genes of distinguishing functional properties and expression territories during vertebrate evolution.

Comparative analysis demonstrated that the various D_1 receptor sequences are very similar. These similarities were inherited from a common ancestor gene after two main duplication steps and have been conserved due to physiological constraints (2,5). The identification of true functional homology between the subtypes of dopamine D_1 receptor present in most vertebrate groups may increase our understanding of the physiological roles of these subtypes. To achieve this, the functional characteristics of the receptors should be systematically compared between subtypes in a given species, and between species belonging to vertebrate groups that diverged at different time points during evolution. This is the only approach that will make it possible to identify the conserved and derived characteristics of each of the D_1 receptor subtypes, selected and retained in the organisms for adaptive purpose.

We studied comparatively the D_1 receptors isolated from a teleost fish, the European eel (*Anguilla anguilla*). We chose to study this fish, well known for its unusual life cycle, because it belongs to one of the earliest diverging groups of ray-finned fish (Actinopterygians). These latter radiated from flesh-finned fish (Sarcopterygians), the lineage that later gave rise to mammals. Thus, functional properties of D_1 receptor subtypes shared by the eel and other vertebrate species

were probably inherited from their common ancestor. The eel has four dopamine D_1 receptors, two D_{1A} (D_{1A1} and D_{1A2}), one D_{1B} and one D_{1C} (6). These receptor subtypes can be partly distinguished by their pharmacological profiles, intrinsic activity and brain distribution (1,6,7). However, little clear functional information is available concerning the D_{1C} subtype, except that NNC 01-0012, a benzazepine compound, may distinguish the D_{1C} receptor from the other subtypes (8).

One major characteristic of receptor function is desensitisation after prolonged exposure to agonist. The desensitisation mechanisms of ß-adrenoreceptors and the related dopamine D_1 receptors, are generally thought to involve two steps (for review see 9). In the first few minutes of agonist exposure the receptor is functionally uncoupled from the G protein. This process requires phosphorylation of the third cytoplasmic loop and the C-terminus of the receptor by G protein-coupled receptor kinase (GRK)[1] and protein kinase A (PKA). Phosphorylation favours the interaction of the receptor with adapter proteins, facilitating clustering in specialised compartments of the membrane. The receptor is then internalised, removing it from the plasma membrane. Desensitisation is a regulatory mechanism which has profound influence on the physiological responses to hormones and neurotransmitters such as dopamine in the whole organism. The phenomenon is also responsible for the vanishing effects of drugs when used for long-term therapeutic purpose. Thus, desensitisation may be an important differentially selected property that may distinguish the various vertebrate D_1 receptor subtypes.

In this study, we compared the desensitisation properties of the three eel D_1 receptor subtypes by measuring their ability to modulate cellular cAMP levels and by analysing the distribution of D_1 receptor/GFP fusion proteins in transfected cells, after exposure to agonist for various time periods.

Experimental procedures

Construction of the D_1 receptor-encoding plasmids

The fusion of a VSV-G tag (10) to the N-terminus of GFP and to the C-terminus of each of the eel D_1 dopamine receptor subtypes was achieved using pEGFP-N1 (Clontech). To ensure the translation of the three fused sequences in a single reading frame, the translation initiation and stop codons of the D_1 receptor sequences were mutated to lysine and valine codons, respectively, by PCR with Pfu DNA Polymerase (Stratagene). The initiation codon of the GFP sequence was mutated to give a valine codon. The VSV-G tag was added by insertion of a double-stranded oligonucleotide into the *Hin*d III site of pEGFP-N1. A sequence encoding a hinge consisting of several amino acids was left between the receptor and GFP sequences, and between the sequences corresponding to the tag at the N-terminus and to the receptor. For the D_{1A2} receptor, the mutations were made in two separate steps, using a unique *Sac* I site within sequence encoding the receptor. The oligonucleotides used for this site-directed mutagenesis and the details of the construction are shown in Figure 1. Each construct was checked by sequencing with ThermoSequenase (Amersham).

Cell Culture and Transfection

COS-7 cells were grown in DMEM with 4.5g/l glucose (Life Technologies) supplemented with 10% calf foetal serum (Dutscher) and 2mM glutamine (Life Technologies), at 37°C in 5% CO_2/95% air. Cells (2 to 3 x 10^6 cells) were electroporated with 10µg DNA, in 300µl of culture medium. Cells were transfected by electroporation using a BioRad Gene Pulser II apparatus with the following parameters: 950µF, 220V and 25-30ms. After electroporation, 100U/ml penicillin/streptomycin was added to the culture medium.

Identical conditions were used for the culture and electroporation of 13.S.1.24 cells (11), except that 10µg/ml gentamycin was added to prevent deviation in the phenotype of this transformed cell line.

Pharmacological and Binding Assay

Confluent cells (in 150mm diameter dishes) were harvested, resuspended in binding buffer (50mM Tris HCl pH 7.4, 120mM NaCl, 5mM KCl, 1.5mM $CaCl_2$, 5mM $MgCl_2$, 5mM EDTA-Na_2) and homogenised with a Polytron apparatus (30 seconds). Membranes were collected by centrifugation for 25 minutes at 10000 x g and rehomogenised in binding buffer. Protein was determined by the Bradford technique (12). Membrane proteins (about 50µg) were mixed with 100pM [^{3}H]-SCH-23390 (test ligand) and serial dilutions (10^{-4} M to 10^{-12} M) of competing drugs (RBI, Sigma-Aldrich, Figure 2). The mixture was incubated for 90 minutes at room temperature and filtered through a GF/C 25mm diameter filter (Whatmann) with a Millipore apparatus. The filter was washed twice (50mM Tris HCl pH 7.4) and radioactivity was counted on a LKB ß counter with scintillation medium (ACS Amersham). Saturation binding assays were carried out as previously described (6). Briefly, membrane proteins were incubated with various concentrations of [^{3}H]-SCH-23390 ($3x10^{-11}$ M to $2x10^{-9}$ M) and non-specific binding was determined in the presence of 10µM (+)-Butaclamol-HCl (RBI).

Desensitisation and cAMP Accumulation Assay

After electroporation, cells were transferred to 24-well plates. Desensitisation protocols were performed 4 days after transfection. Cells were first washed with fresh culture medium and the desensitisation medium was then added and the cells incubated for various periods of time at 37°C. This desensitisation medium contained the D_1 agonist with antioxidant (0.1% ascorbic acid) , the A_1 adenosine receptor antagonist CGS-15943 (10µM, 13) and $ß_2$-receptor antagonist propranolol (10µM). Agonist exposure was stopped by washing the cells twice at 4°C with fresh culture medium containing 0.5mM IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthine, Sigma) and drugs (RBI, see legend of Figure 3). cAMP was allowed to accumulate for 15 minutes with the stimulation compounds and IBMX. The reaction was stopped by incubating with 0.1M HCl for at least 20 minutes to extract cAMP from the cells. The amount of cAMP was determined using the Nordstedt and Freedholm technique (14). In brief, 25µl of each sample was neutralised with 25µl

of 1M Tris pH 7.4 and mixed with 0.2 pmol of [^{3}H]-cAMP (Amersham) and 400µg of cAMP-dependent protein kinase (PKA). The mixture was incubated for two hours at 4°C, filtered through GF/C filters and the radioactivity counted using a scintillation apparatus. For each well, protein was determined by the Bradford technique.

Immunocytochemistry and Observation of Cells

For morphological observations, cells transfected with D_1 receptor-GFP fusion proteins were transferred on coverslips to 24-well plates at a density of 30,000 cells per well. The cells were cultured for two days and then treated with dopamine agonists as described above. The cells were washed and incubated for 15 minutes at room temperature with 3% paraformaldehyde in 0.1mM $CaCl_2$, 0.1mM $MgCl_2$ in PBS. The coverslips were mounted in Mowiol and kept at 4°C until use. Cells were observed with a confocal microscope (Sarastro 2000, Molecular Dynamics) equipped with an argon-krypton laser (3% gain, pinhole of 100µM). All observations were made with a 60x oil-immersion objective (Nikon). The laser was set such that the excitation wavelength was 488nm and the emission wavelength was 510nm.

Results

Characterisation of D_1 receptors fused to the GFP protein

We produced chimaeric proteins by fusing the gene encoding the D_1 receptor with the VSV-G tag and GFP sequences in a single reading frame (Figure 1). This made it possible to

Figure 1 near this place

screen rapidly for expression of the constructs by simply assessing cell fluorescence. We checked that the fusion procedure did not affect the functional properties of the D_1 receptor subtype by analysing the pharmacological profiles of the receptors as well as their ability to increase cAMP levels in transfected COS-7 cells. Several dopaminergic agonists and antagonists (see Figure 2)

were used as competitors of the specific antagonist, [^{3}H]-SCH-23390. Inhibition constants (Ki) were plotted for each of the D_1/D_1-GFP receptor subtype pairs (Figure 2). The line indicates the identityt between the Ki values for the wild-type and chimaeric receptors. In each experiment, the amount of receptors was estimated using Bmax values, and dissociation constants (Kd) were calculated. Kd values tended to increase artificially if the receptor was expressed at a level significantly higher than physiological levels (about 20pmol/mg of protein), as shown for other receptors (15). Thus, all competition experiments were performed in conditions giving similar Kd values for the expressed receptors, that is, ~40pM for D_{1A2} and D_{1A2}-GFP, ~60pM for D_{1B} and D_{1B}-GFP, and ~30pM for D_{1C} and D_{1C}-GFP. Bmax values were about 0.5pmol/mg protein for D_{1A2}, 2pmol/mg protein for D_{1A2}-GFP, 0.5pmol/mg protein for D_{1B}, 1pmol/mg protein for D_{1B}-GFP, 0.5pmol/mg protein for D_{1C} and 0.7pmol/mg protein for D_{1C}-GFP.

Figure 2 near this place

In all transient transfection experiments, the levels of the GFP-fused receptors were higher than those of the unmodified D_1 receptors. This was particularly marked for the D_{1A} receptor, the Ki correlation line of which was displaced towards the D_{1A2}-GFP construct. Nevertheless, the Ki values were very well aligned, demonstrating that the addition of the GFP protein to the C-terminus of the three receptor subtypes did not modify their binding ability. Thus, as far as ligand binding is concerned, GFP-tagging did not seem to affect D_1 receptor structure significantly.

The accumulation of cAMP was assayed in transfected COS-7 cells to determine whether fusion to GFP affected adenylate cyclase activation by the D_1 receptor. The cAMP values were normalised on the basis of total protein and the number of D_1 receptors in each well (Figure 3). In all cases, the wild-type and GFP-fused receptors responded well to dopamine and to the D_1 agonist, SKF-38393, and were blocked by the specific antagonist, SCH-23390, applied 15 minutes before dopamine. Binding assays showed that the larger number of D_{1A2}-GFP receptors than of unmodified D_{1A2} receptors was responsible for the apparently higher basal activity and activation level of the fusion proteins. However, the level of cAMP accumulation with the D_{1A2}-GFP construct was artificially lower than that with D_{1A2}, when divided by the amount of

receptors. Thus, the "receptor reserve" for the D_{1A2}-GFP receptor was larger than that for the D_{1A2} receptor alone, and was a function of maximal cyclase activation.

Figure 3 near this place

Taking into account this limitation, very similar profiles were obtained for the unmodified receptors and GFP/D_1 receptor fusion proteins. Similar basal and activated cAMP levels were observed for each receptor pair. Following dopamine treatment, cAMP levels generally increased to 5 to 10 times basal levels, and were strikingly similar for wild-type and GFP-fused receptors. The inverse agonist property of (+)-Butaclamol that we previously described (6) was observed for D_{1B} and D_{1C} receptors (Figure 3B and C), but was statistically non-significant. Thus, in our experimental conditions, the addition of GFP to the C-terminus of D_1 receptors of the various subtypes did not affect the pharmacological and functional properties of the receptors.

Desensitisation profile of D_1 receptors in transfected cells

The increase in intracellular cAMP levels observed in the experiments described above directly reflected the D_1 receptor-dependent activation of adenylate cyclase. Thus, cAMP levels should also faithfully reflect the D_1 receptor desensitisation occurring on sustained exposure of the cells to agonists.

We first checked that COS-7 cells transfected with the insert-free expression vector (pcDNA3) alone did not respond to the dopamine agonist (apomorphine 10µM) used in all desensitisation experiments. We chose to work with apomorphine because it is a potent stimulator of the dopamine receptor but, unlike dopamine, its efficiency is similar for each of the three D_1 receptor subtypes (Figure 2). Indeed, dopamine may promote apoptosis in cells, independently of D_1 receptor stimulation (unpublished data and 11).

After 15 minutes of exposure to apomorphine, the maximum cAMP level in cells was 5.28 (± 1.16 SEM) pmol/well, reaching 93.95 (± 5.18 SEM) in cells containing 0.55 pmol of D_1 receptor binding sites /mg of total protein. In contrast, the maximum levels of cAMP recorded after

apomorphine exposure in pcDNA3-transfected cells were close to the basal levels measured in D_{1A2} receptor-transfected cells. Finally, even after 12 hours of apomorphine stimulation, cAMP levels in the pcDNA3-transfected cells were not higher than after 15 minutes, showing that the effects observed for the D_1 receptor-transfected cells are indeed specific to the exogenous receptors.

Figure 4 near this place

The cAMP accumulation profiles obtained with transfected COS-7 cells after various times of exposure to 10µM apomorphine were then used to analyse the desensitisation behaviour of the three D_1 receptor subtypes (Figure 4). For the D_{1A2} receptor, the decrease in receptor activity was maximal in the first 5 minutes of agonist exposure. The 50% decrease in cAMP accumulation levels was maintained until the end of the first hour of agonist exposure. Thereafter, cAMP levels increased slightly, followed by a further major decrease in receptor activity. Thus, agonist treatment for at least 6 hours resulted in cAMP levels 75% lower than those obtained after maximal stimulation of untreated cells.

For the D_{1B} receptor (Figure 4), the level of cAMP accumulation elicited by prolonged activation was remarkably low. The maximal levels of cAMP obtained with the D_{1A2} receptor were about 2.5 times those for the D_{1B} receptor. Nevertheless, the desensitisation profiles of these two receptor subtypes were similar. After the first 5 minutes, cAMP levels were about 40% lower than those for maximum stimulation. Thereafter, cAMP levels remained stable until the end of the first hour of agonist exposure, increased slightly, then decreased again to 25% of maximal levels, as for the D_{1A2} receptor. However, the small increase in cAMP levels observed in the desensitisation profile of the D_{1A2} receptor was less marked than that for D_{1B}.

Maximal apomorphine stimulation of cells transfected with the D_{1C} receptor subtype gave cAMP levels only slightly lower than those obtained with the D_{1A2} receptor subtype. However, even after 12 hours of agonist exposure, no overall decrease in cAMP level was observed. A small decrease was observed after 5 minutes of agonist exposure, but this disappeared after 30 minutes

Table 1 near this place

and, even for prolonged treatment, no significant change in cAMP levels was observed.

To rule out possible effects of prolonged dopamine agonist treatment on the activity of adenylate cyclase itself, we measured the cAMP levels attained following stimulation with 10µM forskolin, in cells treated with apomorphine for the periods of time identical to those used to study D_1 receptor desensitisation (Table 1). No significant decrease in forskolin-induced cAMP accumulation was observed for any of the D_1 receptor subtypes, indicating that the adenylate cyclase in the COS-7 cells was still fully active, even after prolonged stimulation by the D_1 receptor.

D_1 dopamine receptor-GFP fusion proteins were produced to follow the intracellular trafficking of the receptor after agonist treatment. As this phenomenon depends principally of the C-terminus of the receptor, we checked that the addition of GFP did not modify the overall receptor desensitisation profile. The addition of GFP appeared to have no effect because the cAMP accumulation pattern of the GFP-receptor fusions did not differ from that of wild-type receptors (Figure 5A). Therefore, the fusion of GFP to the C-terminus of the receptor modified neither ligand binding properties nor adenylate cyclase activation and receptor desensitisation profiles.

Figure 5 near this place

Desensitisation of D_1 receptors in 13.S.1.24 cells derived from rat olfactory epithelium

To validate the use of desensitisation profiles as a general means for characterising D_1 dopamine receptor subtypes in vertebrates, we wanted to test another cell type, more closely related to neurones. This was important because it was possible that the characteristics of D_1 desensitisation observed in COS-7 cells were specific to COS-7 cells. We therefore applied the same protocol to the neuron-like 13.S.1.24 cell line derived from the olfactory mucosa (11). The maximum level of cAMP on stimulation of the wild-type D_1 receptor in 13.S.1.24 cells was twice that in COS-7 cells (Figure 4). Nevertheless, the desensitisation profiles of D_1 receptor subtypes in 13.S.1.24 cells were very similar to those in COS-7 cells (Figure 5B). The desensitisation of D_{1A2}

and D_{1B} receptors in 13.S.1.24 cells presented a two-phase profile, with an initial sharp decrease in cAMP levels within minutes of agonist exposure, followed by a further large decrease after one hour. As in COS-7 cells, total cAMP level was lower for D_{1B} than for D_{1A2}, and the D_{1C} receptor did not undergo desensitisation. These results suggest that the desensitisation profiles described for the three subtypes of dopamine D_1 receptors are largely independent of cell type.

Desensitisation of the D_1 receptor depends on C-terminal sequences

Previous studies have shown that the C-terminus of G protein-coupled receptors bears the structural components required for desensitisation (16). We therefore used chimaeric D_1 receptors in which the C-terminus of one D_1 receptor subtype was replaced by that of another subtype (17). Unfortunately, we were unable to obtain a $D_{1A}/D_{1B\text{-Cter}}$ chimaera produced to a significant level in transfected cells. The reverse $D_{1B}/D_{1A\text{-Cter}}$ chimaera was, however, fully functional. The desensitisation profile of this fusion protein resembled neither that of the D_{1A} receptor nor that of the D_{1B} receptor (Figure 6). Although the overall decrease in cAMP was also about 70% of the

Figure 6 near this place

value for maximal stimulation, the biphasic nature of the decrease was not as marked as for the wild-type D_{1A2} and D_{1B} receptors. A different profile was obtained for D_{1A}/D_{1C} chimaera. The D_{1A} receptor did not undergo desensitisation when fused to the C-terminus of D_{1C}. Indeed, cAMP levels after 12 hours of agonist exposure remained similar to those for maximal stimulation. In contrast, if the chimaera harboured the C-terminus of the D_{1A} receptor, cAMP levels decreased to 40% of maximal stimulation. However, the desensitisation profile obtained with this $D_{1C}/D_{1A\text{-Cter}}$ chimaera after 12 hours of agonist exposure was also not identical to that for the D_{1A} receptor itself. These data suggest that, although the C-terminal sequence may account for a large part of the desensitisation characteristics of the D_1 receptor subtype, other part of the protein are probably also involved in this process.

Cellular distribution of the D_1 receptor-GFP fusion protein after agonist exposure

Figure 7 near this place

The three D_1 receptor subtypes fused to GFP were used to analyse the cellular pattern of receptor desensitisation in transfected COS-7 cells. The D_1 receptor-GFP fusion protein was produced in large quantities and labelled the secretion pathway, including the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum, intensely in all transfected cells (Figure 7). Diffuse staining was detected at the edge of the cells, characteristic of plasma membrane labelling. Fluorescence levels were also clearly higher at membrane folds and points of cell-cell contact. These observations indicate that the GFP constructs are probably fully functional, and that GFP fluorescence is not masked by fusion to the receptor. In addition, all the various receptor subtypes were clearly present at the plasma membrane, as expected for a membrane receptor.

Figure 8 near this place

We analysed by confocal microscopy a large number of cells exposed to the agonist apomorphine, in the same conditions used for our biochemical experiments. The distribution of receptors did not appear to be greatly affected for any of the three D_1 receptor subtypes. Nevertheless, a few characteristic features were identified on close examination of the cellular location of the GFP-receptor fusion protein. After 5 minutes of agonist exposure, and for up to 30 minutes, D_{1A2} and D_{1B} receptor labelling was very strong with clear densification at some places (Figure 8 open arrowhead). After 6 hours of agonist exposure, labelling of the plasma membrane decreased for the GFP-tagged D_{1A2} receptor, whereas this effect was less pronounced for the D_{1B} receptor. Twelve hours after the start of agonist treatment, the D_{1A2}-GFP receptor was barely detectable at the plasma membrane, whereas there was some residual labelling for the D_{1B}-GFP fusion protein (Figure 8, solid arrowhead). More precise analysis of changes in the intracellular

location of GFP-tagged D_1 receptors was not possible due to the strong fluorescence of the receptor-GFP fusion in the secretory pathway. In none of the experimental conditions used was any significant change in the subcellular distribution of the tagged D_{1C} receptor observed, consistent with the lack of functional desensitisation characteristic of this receptor subtype.

Discussion

The combination of biochemical and cytological data obtained in this study shows that each of the three D_1 receptor subtypes displayed a specific desensitisation profile. In addition, the decrease in the efficiency of D_1 receptor-dependent cyclase stimulation appeared to be independent of the morphological consequences of the long-term exposure of cells to D_1 receptor agonists.

This study was carried out with COS-7 cells, which are highly suitable for studying receptor desensitisation. The cell cytoplasm is more spread out than that in other cell types used to study the D_1 receptor, such as Sf9 cells (18). Unlike COS-1 cells (19), cAMP accumulation is not stimulated by dopamine treatment in COS-7 cells, suggesting that these cells do not normally express D_1 receptors. In contrast, as COS-7 cells do express a functional $ß_2$-adrenergic receptor, a receptor closely related to D_1, the cell components required for receptor desensitisation should be present. Moreover, in transfected COS-7 cells, D_1 dopamine receptor stimulation elicits a marked accumulation of cAMP relative to basal levels. The desensitisation characteristics observed were dependent on neither cell type (Figure 5) nor adenylate cyclase regulation (Table I). Therefore, the desensitisation profiles obtained for each of the D_1 receptor subtypes depended largely on the receptor itself.

To be fully significant, the desensitisation time course for the eel D_1 receptor subtypes has to be compared with those obtained for the same subtypes in other vertebrate species. All previous investigations of D_1 receptor desensitisation have concerned mammals, initially with no subtype discrimination. In mouse striatum primary cultures, D_1 receptor desensitisation was found to begin after 15 minutes, but maximal reduction of adenylate cyclase activity (50%) was achieved only

after 18 hours (20). As the mammalian striatum expresses mainly D_{1A} receptors, this is consistent with our own observations.

A two-phase desensitisation profile similar to that described here for eel D_{1A} receptors was found in mouse adrenocortical cells transfected with human D_{1A} receptors (21). In cells treated with 10µM dopamine, most of the decrease in adenylate cyclase activity (40%) was achieved after 30 minutes, with a small increase in activity after one hour. A similar desensitisation profile has also been described for the monkey D_{1A} receptor expressed in rat C6 glioma cells (22). In this cell line, rapid desensitisation occurred within the first 15 minutes, before a small rebound after 30 minutes. The second and stronger decrease in cAMP production (by 80% of maximal cAMP levels), was maximal after 2 hours of agonist stimulation. Experiments in which D_{1A} was transiently produced in Sf9 insect cells showed a 40% reduction in maximal adenylate cyclase stimulation within the first 15 minutes of dopamine exposure (10µM, 18). Despite the use of different cell types and of receptors from different vertebrate species, the general descriptions of the desensitisation profile of the D_{1A} receptor subtype are remarkably similar. Thus, the two-phase desensitisation profile we observed for the fish D_{1A} receptor subtype is certainly a conserved and discriminating property of the vertebrate D_{1A} receptor subtype. These experiments also indicate that the cell transduction machinery used by D_1 dopamine receptors (and by the related ß-adrenoreceptors) is ubiquitous (23).

What is the significance of this two-phase process? Several authors have suggested that the first step (reviewed in 24) corresponds to the uncoupling of the receptor from the G protein. This requires phosphorylation of the C-terminus of the receptor by a non-specific kinase, such as PKA, or a specific kinase, such as GRK. Evidence for this is provided by the maximal phosphorylation of the human D_{1A} receptor after 5 minutes of dopamine exposure (25). In contrast, the second decrease in cAMP levels may correspond to a completely different desensitisation process, the internalisation of the receptor in endocytotic vesicles. This phenomenon has been described as being spatially and temporally separated from the uncoupling mechanism (18). After internalisation,

the agonist no longer has access to the receptor and the overall activity of the receptor pool decreases throughout the cell.

It has been shown that the D_{1B}/D_5 receptor has a high intrinsic level of activity in species as distantly related as humans (26) and eels (6). As shown for the human D_{1B}/D_5 receptor, basal cAMP levels for the eel D_{1B} receptor were almost twice those of the D_{1A2} subtype. The desensitisation profile of the D_{1B} receptor showed that maximum cAMP levels were lower than those for the D_{1A2} receptor subtype. This may be due to the high basal activity of the D_{1B} receptor, favouring "constitutive" desensitisation of the receptor, as has been suggested for the constitutively active $ß_2$-adrenergic mutant receptors (27). This phenomenon has been shown to be correlated with higher levels of phosphorylation of the mutant receptor by GRK2 (28). Comparative desensitisation studies have also been performed for human D_{1A} and D_{1B} receptors expressed in Ltk- cells (29). Again, twice as much cAMP accumulated for D_{1A} than for the D_{1B} receptor. Although the maximum decrease in adenylate cyclase activation was smaller in this study, the differences in desensitisation profile between D_{1B} and D_{1A} were the same. We therefore suggest that a high level of intrinsic activity and attenuated desensitisation profiles are important distinguishing characteristics of vertebrate D_{1B}/D_5 receptors.

The lack of desensitisation observed for D_{1c} receptors constitutes the first clear functional discriminating characteristic of this subtype. Confocal microscopy showed that this lack of desensitisation was not due to the receptor being incorrectly located in the plasma membrane (Figure 7). Alternatively, the lack of D_{1C} receptor desensitisation may account for the absence of crucial factors in the cells in which we tested it. This is unlikely, however, because it has been observed in two very different cell lines, COS-7 (fibroblasts) and 13.S.1.24 neuronal cells. This property of the D_{1C} receptor subtype raises questions about its physiological role. D_{1C} mRNA has a highly restricted distribution in the eel brain, being present mainly in the dorsal hypothalamic nuclei and habenula (7). This suggests a very specific effect for the D_{1C} receptor in neuroendocrine regulation.

The results obtained with fusion proteins clearly show that general desensitisation properties depend largely on the C-terminal end of the receptor. In particular, the D_{1A} receptor became resistant to desensitisation if fused to the C-terminus of the D_{1C} receptor, and the reverse experiment resulted in desensitisation of the D_{1C} receptor. However, the $D_{1C}/D_{1A\text{-}Cter}$ chimaera was desensitised only after 30 minutes and did not exhibit the two-phase profile. Internalisation of the receptor was probably involved, but not the fast receptor-G protein uncoupling that occurs soon after agonist exposure. Further studies are required to determine whether G-protein uncoupling requires sequences present in the third cytoplasmic loop but not in the C-terminus. Comparison of the sequences of the third cytoplasmic loop and of the cytoplasmic C-termini of D_{1A}, D_{1B} and D_{1C} receptors from various vertebrates species identified residues with the potential to become phosphorylated that were both subtype-specific and conserved among species (not shown). Although the consensus sequences for desensitisation have not been defined, this observation may account for some of the differences in desensitisation observed between D_1 receptor subtypes. $ß_3$-receptors, a subtype of ß-adrenoreceptor, also fails to undergo desensitisation (30). It has been suggested that this is due to a lack of phosphorylatable residues in the C-terminus, which is not the case for D_{1C} receptors. Nevertheless, specific phosphorylation of the third cytoplasmic loop or of the C-terminus may account for the differential sensitivity of interactions with protein partners. For example, cyclase activation is weaker if the rat D_{1A} receptor is coexpressed with GRK5 than if it is coexpressed with GRK2 or GRK3 (25).

The measurement of Bmax values is an imperfect and inaccurate way to evaluate possible changes in receptor number at the cell surface. Nevertheless, the changes in ligand binding measured do not correlate with the cAMP accumulation values obtained for the various agonists. Thus, for dopamine, the decrease in binding ability in C6 rat glioma cells transfected with D_{1A} receptor did not exceed 35% (22). These findings provide strong evidence against desensitisation being due simply to dopamine receptor internalisation and degradation. More specific studies of the human D_{1A} receptor involving cell fractionation have shown that after one hour of treatment, only 28% of the cell surface receptors were internalised in the light vesicular fraction (18).

Immunocytochemical observations with thin confocal sections showed a slight decrease in cell surface receptor labelling, partly because the Sf9 insect cells used to express the receptor are round, with only a small band of cytoplasm between the nucleus and the plasma membrane. The same group showed in previous studies that, in addition to this decrease in labelling at the plasma membrane, aggregates of receptor were observed at the cell surface (31). As antibodies specifically recognising each of the D_1 receptor subtypes are unavailable, we produced receptor/GFP fusion proteins. Previous experiments with the $ß_2$-adrenergic receptor (32) and other G protein-coupled receptors showed that the addition of GFP to the C-terminus of a receptor did not significantly change receptor characteristics. We checked thoroughly that the pharmacological profile, the general activation properties and correct location of D_1 receptor subtypes at the plasma membrane were not affected by GFP-tagging. The biochemical desensitisation profile of the D_1-GFP receptor in COS-7 cells was also shown to be identical to that of the unmodified D_1 receptor.

Careful study of the behaviour of our D_1 receptor-GFP fusions by confocal microscopy revealed no dramatic difference from controls if cells were exposed to agonists. Clearly, the considerable intracellular receptor fluorescence (the secretory pathway) promoted by transient transfection may mask increases in the number of receptors transported into cells. In particular, we observed no aggregates of D_1 receptor at the membrane surface, although D_{1A} receptor staining at the plasma membrane became more dense after 5 minutes of agonist treatment. This may correspond to a change in the interactions of dopamine receptors with the molecular partners involved in desensitisation. Desensitisation was less marked for D_{1B} than for the D_{1A} receptor subtype due to D_{1B} constitutive activity, and this probably accounts for the lack of striking change in the fluorescence of the D_{1B} receptor at the plasma membrane during desensitisation. The presence of a permanent pool of D_{1B} receptors in endocytic compartments might mask the internalisation induced. Finally, morphological examination also supported the fact that D_{1C} receptor subtype is basically insensitive to desensitisation.

Other techniques have been used for studying internalisation of dopamine receptors. Ariano *et al.* used antibodies specific for the rat D_{1A} receptor subtype in transfected CHO cell lines and

primary striatal cultures. They observed a marked decrease in receptor staining after 15 minutes of exposure to 50µM dopamine (33). This rapid, extensive loss of staining appears inconsistent with a physiological degradation time course, and is probably related to epitope masking. Electron microscopy studies with the D_{1A} receptor in rat striatum showed that internalisation occurred 4 minutes after agonist injection, and that receptors were present in endosomes but not in the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum or lysosomes (34). In agreement with these observations, Vickery and von Zastrow recently describe the internalisation of D_{1A} in a dynamin dependant pathway in cells which coexpressed the D_2 dopamine receptor (35). The techniques used by the authors is very different than ours since they applied anti-N-terminal tag antibodies directly on the living cells, allowing to detect only endocytosed receptors. Thus, the real proportion of internalised receptors as compared to the total amount of receptor present in cells is difficult to asses. Our data extend these observations by showing that, only a small proportion of the receptors are able to undergo endocytosis upon agonist exposure. Thus, the use of fluorescent receptors, such those described here, for dynamic observations at high resolution, will be of great value provided that most of the secretory pathway fluorescence can be prevented.

One major conclusion can be drawn from our observations. There is no direct correlation between functional events in receptor desensitisation and the removal of the receptors from the plasma membrane into specific intracellular compartments of the endocytotic pathway. However, although functional desensitisation and receptor endocytosis are different phenomenons, part of the mechanisms of the former are required for the secong to occur. This study also shows that desensitisation is a major character for distinguishing between D_1 receptor subtypes. Desensitisation characteristics, which are conserved among vertebrates including human, were acquired and fixed after the gene duplications that generated the corresponding receptor subtypes during vertebrate evolution. They also provide a more complete view of dopamine receptor function which is necessary to understand the physiology of dopamine systems. The desensitisation profile of the D_{1A} receptor subtype is very typical and indicates the major regulation that this subtype may undergo in physiological situations. In mammals, D_{1A} is located close to the synaptic site of

dopamine release (36,37), concordant with its rapid and effective desensitisation. In contrast, the D_{1B} receptor is found on dendritic shafts, far from synapses. This may account for the conserved high intrinsic activity, which promotes permanent dopaminergic tonus in neurons. It also accounts for the smaller amplitude of desensitisation of the D_{1B} receptor. Finally, the D_{1C}, the only D_1 receptor subtype which has not been found in mammals, does not undergo desensitisation, but its precise location in neuronal networks is unknown. However, given its restricted distribution in the fish brain, this receptor subtype is probably involved in very specific responses to dopamine. We suggest that the role of the D_{1C} receptor is related to adaptive neuroendocrine functions that are not used in mammals.

Acknowledgements

Many thanks to K. Sugamori for providing us with the D_1 receptor chimæra, J. Knight and Y.v. Boxberg for helpful comments on this article and to J-D. Vincent for constant support. S. Le Crom was supported by a grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche. Work in our laboratory is supported by CNRS, Université Paris XI, Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale.

References

1. Niznik, H. B., Liu, F., Sugamori, K. S., Cardinaud, B., and Vernier, P. (1998) *Advances in Pharmacology* **42,** 404-408

2. Cardinaud, B., Gibert, J.-M., Liu, F., Sugamori, K. S., Vincent, J.-D., Niznik, H. B., and Vernier, P. (1998) *Advances in Pharmacology* **42,** 936-940

3. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998) *Physiological Reviews* **78**(1)**,** 189-225

4. Civelli, O., Bunzow, J. R., and GRandy, D. K. (1993) *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32,** 281-307

5. Vernier, P., Cardinaud, B., Valdenaire, O., Philippe, H., and Vincent, J.-D. (1995) *Trends in Pharmacological Sciences* **16,** 375-381

6. Cardinaud, B., Sugamori, K. S., Coudouel, S., Vincent, J., Niznik, H. B., and Vernier, P. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **272**(5)**,** 2778-2787

7. Kapsimali, M., Vidal, B., Gonzalez, A., Dufour, S., and Vernier, P. (2000) *Journal of Comparative Neurology* **419**(3)**,** 320-43

8. Sugamori, K. S., Hamadanizadeh, S. A., Scheideler, M. A., Hohlweg, R., Vernier, P., and Niznik, H. B. (1998) *Journal of Neurochemistry* **71**(4)**,** 1685-1693

9. Ferguson, S. S. G., and Caron, M. G. (1998) *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**(2)**,** 119-127

10. Kreis, T. E. (1986) *EMBO Journal* **5**(5)**,** 931-941

11. Coronas, V., Feron, F., Hen, R., Sicard, G., Jourdan, F., and Moyse, E. (1997) *Journal of Neurochemistry* **69**(5)**,** 1870-1881

12. Bradford, M. M. (1976) *Analytical Biochemistry* **72,** 248-254

13. Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casado, V., Canela, E. I., Rondin, S., Lew, J. Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L. F., Verniera, P., Lluis, C., Ferre, S., Fuxe, K., and Franco, R. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15)**,** 8606-11

14. Nordstedt, C., and Fredholm, B. B. (1990) *Analytical Biochemistry* **189,** 231-234

15. Leysen, J. E., and Gommeren, W. (1981) *Journal of Neurochemistry* **36**(1)**,** 201-219

16. Fukushima, Y., Asano, T., Takata, K., Funaki, M., Ogihara, T., Anai, M., Tsukuda, K., Saitoh, T., Katagiri, H., Aihara, M., Matsuhashi, N., Oka, Y., Yazaki, Y., and Sugano, K. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **272**(31)**,** 19464-19470

17. Sugamori, K. S., Scheideler, M. A., Vernier, P., and Niznik, H. B. (1998) *Journal of Neurochemistry* **71**(6)**,** 2593-2599

18. Ng, G. Y., Trogadis, J., Stevens, J., Bouvier, M., O'Dowd, B., and George, S. R. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92,** 10157-10161

19. Steffey, M. E., Snyder, G. L., Barrett, R. W., Fink, J. S., Ackerman, M., Adams, P., Bhatt, R., Gomez, E., and MacKenzie, R. G. (1991) *European Journal of Pharmacology* **207,** 311-317

20. Chneiweiss, H., Glowinski, J., and Premont, J. (1990) *European Journal of Pharmacology* **189,** 287-292

21. Olson, M. F., and Schimmer, B. P. (1992) *Molecular Endocrinology* **6,** 1095-1102

22. Lewis, M. M., Watts, V. J., Lawler, C. P., Nichols, D. E., and Mailman, R. B. (1998) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **286**(1)**,** 345-353

23. Yokoyama, S., and Starmer, W. (1992) *Journal of Molecular Evolution* **35,** 230-238

24. Hausdorff, W. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *FASEB Journal* **4,** 2881-2889

25. Tiberi, M., Nash, S. R., Bertrand, L., Lefkovitz, R. J., and Caron, M. G. (1996) *Journal of Biological Chemistry* **271**(7)**,** 3771-3778

26. Tiberi, M., and Caron, M. G. (1994) *Journal of Biological Chemistry* **269**(45)**,** 27925-27931

27. Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R. J. (1993) *Journal of Biological Chemistry* **268**(7)**,** 4625-4636

28. Pei, G., Samama, P., Lohse, M., Wang, M., Codina, J., and Lefkowitz, R. J. (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91,** 2699-2702

29. Jarvie, K. R., Tiberi, M., Silvia, C., Gingrich, J. A., and Caron, M. G. (1993) *Journal of Receptor Research* **13**(1-4)**,** 573-590

30. Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L. J., Zilberfarb, V., Strosberg, A. D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1993) *Molecular Pharmacology* **43**(4)**,** 548-555

31. Ng, G. Y., Mouillac, B., George, S. R., Caron, M., Dennis, M., Bouvier, M., and O'Dowd, B. F. (1994) *European Journal of Pharmacology* **267,** 7-19

32. Barak, L. S., Ferguson, S. S. G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T., and Caron, M. G. (1997) *Molecular Pharmacology* **51,** 177-184

33. Ariano, M. A., Sortwell, C. E., Ray, M., Altemus, K. L., Sibley, D. R., and Levine, M. S. (1997) *Synapse* **27**(4)**,** 313-321

34. Dumartin, B., Caille, I., Gonon, F., and Bloch, B. (1998) *Journal of Neuroscience* **18**(5)**,** 1650-1661

35. Vickery, R. G., and von Zastrow, M. (1999) *Journal of Cell Biology* **144**(1)**,** 31-43

36. Caillé, I., Dumartin, B., and Bloch, B. (1996) *Brain Research* **730,** 17-31

37. Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J. F., Pappy, M., Levenson, R., and Goldman-Rakic, P. S. (1995) *Journal of Neuroscience* **15**(12)**,** 7821-7836

Footnotes

[1] The abbreviation used are: GRK, G protein-coupled receptor kinase; PKA, protein kinase A; GFP, green fluorescent protein; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; VSV-G, vesicular stomatitis virus-glycoprotein; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; PBS, Phosphate-buffered saline; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SEM, standard error mean.

Figure legends

Figure 1: The D_1 receptor-GFP fusion proteins

Fusion proteins consisting of each of the subtypes of eel D_1 dopamine receptor fused to the VSV-G tag at the N-terminus and GFP at the C-terminus were produced by expression from a plasmid as described in methods. The oligonucleotides used are indicated above their complementary sequences and all mutations are indicated. A sequence encoding a two-amino acid hinge was added between the VSV-G tag and the receptor coding sequences, and a sequence encoding six amino acids was inserted between the receptor and GFP coding sequences (black boxes). The main restriction sites used for the constructs are also indicated.

Figure 2: Correlation plots for the Ki obtained for the D_1 receptor subtypes and the corresponding D_1-GFP fusion proteins

COS-7 cell membranes expressing either D_1 or D_1-GFP receptor fused to Green Fluorescent Protein were incubated with 100pM [^{3}H]-SCH-23390 in the presence of dopaminergic agonist (closed circles), antagonist (open circles) and inverse agonist (squares). The estimated inhibitory constants (Ki) for [^{3}H]-SCH-23390 binding obtained in these experiments were plotted on a correlation graph for each D_1/D_1-GFP receptor pair. The line corresponds to equimolarity or identity for each plot.

Figure 3: cAMP accumulation assay for assessing comparative activity in COS-7 cells transfected with D_1 and D_1-GFP fusion receptors

COS-7 cells, transfected with D_1 receptor subtypes, either wild-type or fused to GFP, were incubated with various drugs at a final concentration of 10µM in the presence of 10µM propranolol and 0.5mM IBMX. The amount of cAMP is shown for basal levels (open bars), dopamine (finely hatched bars), SKF-38393 (grey bars), dopamine and SCH-23390 (coarsely hatched bars), SCH-23390 alone (stippled bars) and (+)-butaclamol (black bars). The amount of cAMP in each well was divided by the amounts of protein and receptor per well. The Bmax values obtained were from 2.4 to 3.8 pmol/mg protein, except for the D_{1A2} receptor, for which Bmax was about 0.5 pmol/mg protein. The results shown on the plot are the means of four experiments, each performed in duplicate. The error bars indicate the SEM.

Figure 4: Desensitisation profile of the D_1 receptor subtypes in COS-7 cells, as determined by cAMP accumulation assay

Cells transfected with each D_1 receptor subtype were treated with 10µM apomorphine, 10µM CGS-15943 and 10µM propranolol for 5 minutes (open bar), 30 minutes (coarsely hatched bar), 1 hour (black bar), 6 hours (stippled bar) and 12 hours (finely hatched bar). cAMP was allowed to accumulate for 15 minutes in the presence of 10µM dopamine, 10µM CGS-15943, 10µM propranolol and 0.5mM IBMX. Maximal stimulation (grey bar) corresponds to cells not subjected to the initial treatment. The cAMP values were divided by the amount of protein and the number of receptors (Bmax) in the COS-7 cells, per well. This graph is the mean of eight independent experiments, each performed in duplicate. The error bars indicate SEM values.

Figure 5: Desensitisation profiles for GFP-tagged receptors in COS-7 cells and for wild-type receptors in 13.S.1.24 cells.

All the desensitisation profiles were obtained in the same conditions as described for Figure 4. A: Fusion proteins consisting of each D_1 receptor subtype fused to GFP were transiently produced in COS-7 cells. B: Wild type D_1 receptor subtypes were used for the transient transfection of 13.S.1.24 cells. The maximal stimulation bar corresponds to non-pre-treated cells. The cAMP values were divided by the amount of protein and the number of receptors (Bmax) expressed in

COS-7 cells, per well. These graphs are the mean of four independent experiments, each performed in duplicate. The error bars indicate SEM values.

Figure 6: Desensitisation profiles for D_1 receptor chimaeras in which the C-terminal sequences of the various D_1 receptors have been exchanged.

Desensitisation experiments were carried out using apomorphine as D_1 agonist and dopamine to stimulate the D_1 receptor, as for Figure 4. COS-7 cells were transiently transfected with the D_1 receptor chimaeras, made from *Xenopus* sequences. The maximal stimulation bar corresponds to non-pre-treated cells. The cAMP values obtained were divided by the amount of protein in each well. The values obtained are expressed as a percentage of maximal stimulation. These graphs are the mean of four independent experiments, each performed in duplicate. The error bars indicate SEM values.

Figure 7: Distribution of the D_1 receptor / GFP fusion proteins in COS-7 cells

The distribution of D_1-GFP fusion proteins was observed with a confocal microscope after transient transfection of COS-7 with the chimaeric receptor. All three receptor subtypes D_{1A2} (A), D_{1B} (B) and D_{1C} (C) were present in the plasma membrane (open arrowhead). Due to the high level of receptor expression, the secretion pathway (Golgi apparatus and endoplasmic reticulum) is highly labelled (solid arrowhead). The bar corresponds to 10µm.

Figure 8: Morphological correlates of D_1 receptor-GFP fusion protein desensitisation in COS-7 cells.

The fluorescence of GFP was used to follow the cellular location of the D_1 receptor subtypes during a desensitisation time course performed in the same condition as the biochemical experiments (Figure 4). COS-7 cells were transiently transfected with the three subtypes D_{1A2} (A, B, C, D, E), D_{1B} (F, G, H, I, J) and D_{1C} (K, L, M, N, O) fused to GFP, by electroporation, as described in methods. Cells were treated with the dopamine agonist, apomorphine, for 5 minutes (A, F, K), 30 minutes (B, G, L), 1 hour (C, H, M), 6 hours (D, I, N) or 12 hours (E, J, O) and analysed by confocal microscopy. In some cases, short-term treatment with agonist intensified

GFP labelling at the plasma membrane (open arrowhead). For longer periods of exposure to agonist, GFP labelling strongly decreased or disappeared at the cell periphery (solid arrowhead). The bar corresponds to 10µm.

Table

Table I. Absence of adenylate cyclase desensitisation during D_1 receptor subtype desensitisation

	cAMP accumulation by forskolin[a] (fmoles of cAMP/fmoles of receptor) after diffrent times of apomorphine (10µM) treatment											
	Maximal		5'		30'		1h		6h		12h	
D_{1A2}	7809,99±	627,2	8005,37±	313,4	7921,09±	273,2	7967,68±	280,1	7852,08±	226,2	7299,1±	803,6
D_{1B}	6747,96±	233,9	8611,93±	396,4	8814,43±	678,6	8852,12±	335,3	9430,56±	768,0	9606,67±	776,1
D_{1C}	8422,67±	911,7	8506,28±	901,3	8512,74±	444,3	6595,28±	444,2	7333,24±	561,7	6587,96±	393,2

[a]Experiment conducted as for figure 4. cAMP values (±SEM, n = 4) were divided by the protein amount in each well and by the receptor number (Bmax) expressed in COS-7 cells.

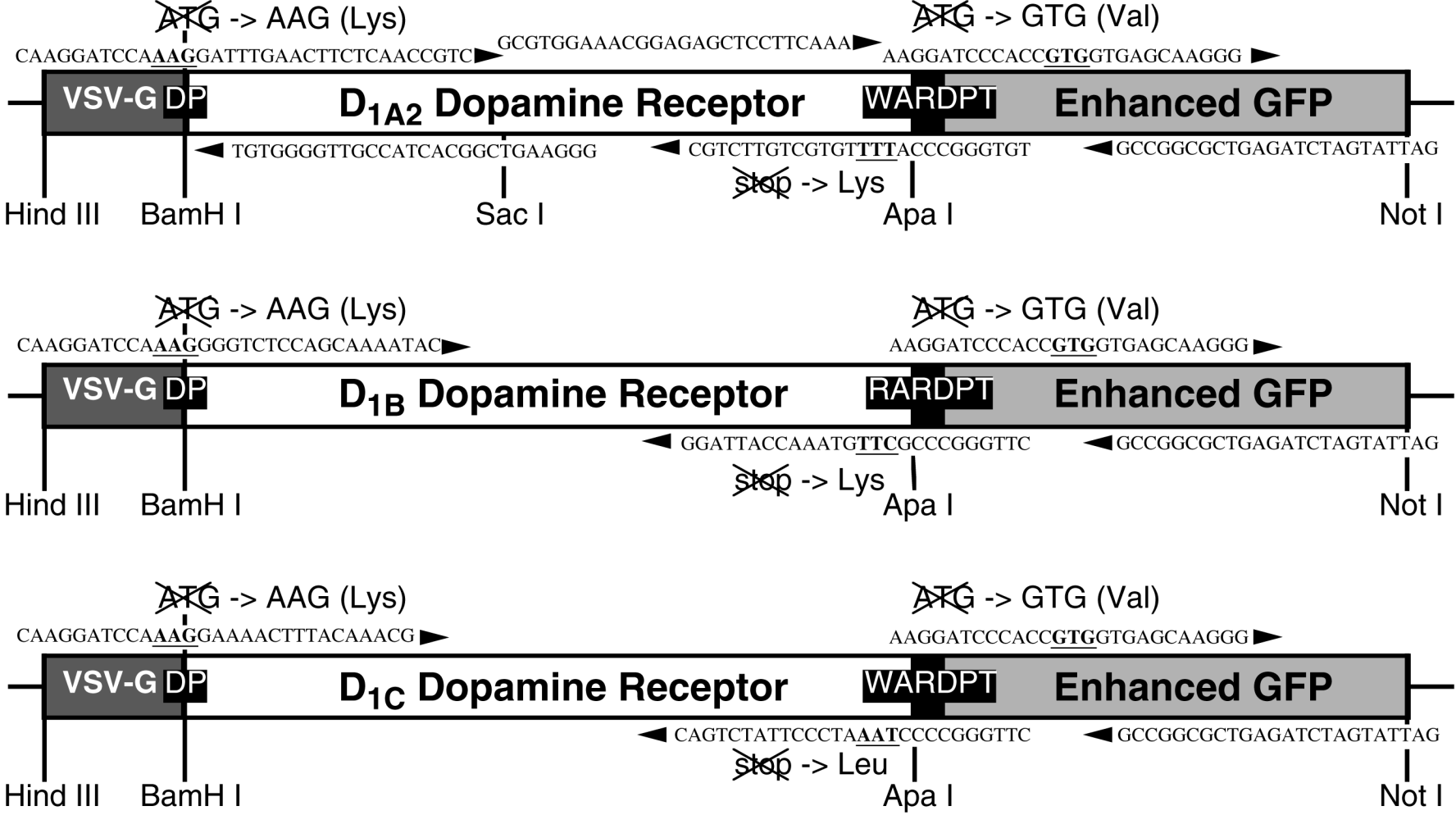

ATG -> AAG (Lys)
ATG -> GTG (Val)
CAAGGATCCAAAGGATTTGAACTTCTCAACCGTC
GCGTGGAAACGGAGAGCTCCTTCAAA
AAGGATCCCACCGTGGTGAGCAAGGG
VSV-G
DP
D1A2 Dopamine Receptor
WARDPT
Enhanced GFP
TGTGGGGTTGCCATCACGGCTGAAGGG
CGTCTTGTCGTGTTTTACCCGGGTGT
GCCGGCGCTGAGATCTAGTATTAG
stop -> Lys
Hind III
BamH I
Sac I
Apa I
Not I
ATG -> AAG (Lys)
ATG -> GTG (Val)
CAAGGATCCAAAGGGGTCTCCAGCAAAATAC
AAGGATCCCACCGTGGTGAGCAAGGG
VSV-G
DP
D1B Dopamine Receptor
RARDPT
Enhanced GFP
GGATTACCAAATGTTCGCCCGGGTTC
GCCGGCGCTGAGATCTAGTATTAG
stop -> Lys
Hind III
BamH I
Apa I
Not I
ATG -> AAG (Lys)
ATG -> GTG (Val)
CAAGGATCCAAAGGAAAACTTTACAAACG
AAGGATCCCACCGTGGTGAGCAAGGG
VSV-G
DP
D1C Dopamine Receptor
WARDPT
Enhanced GFP
CAGTCTATTCCCTAAATCCCCGGGTTC
GCCGGCGCTGAGATCTAGTATTAG
stop -> Leu
Hind III
BamH I
Apa I
Not I

Figure 1

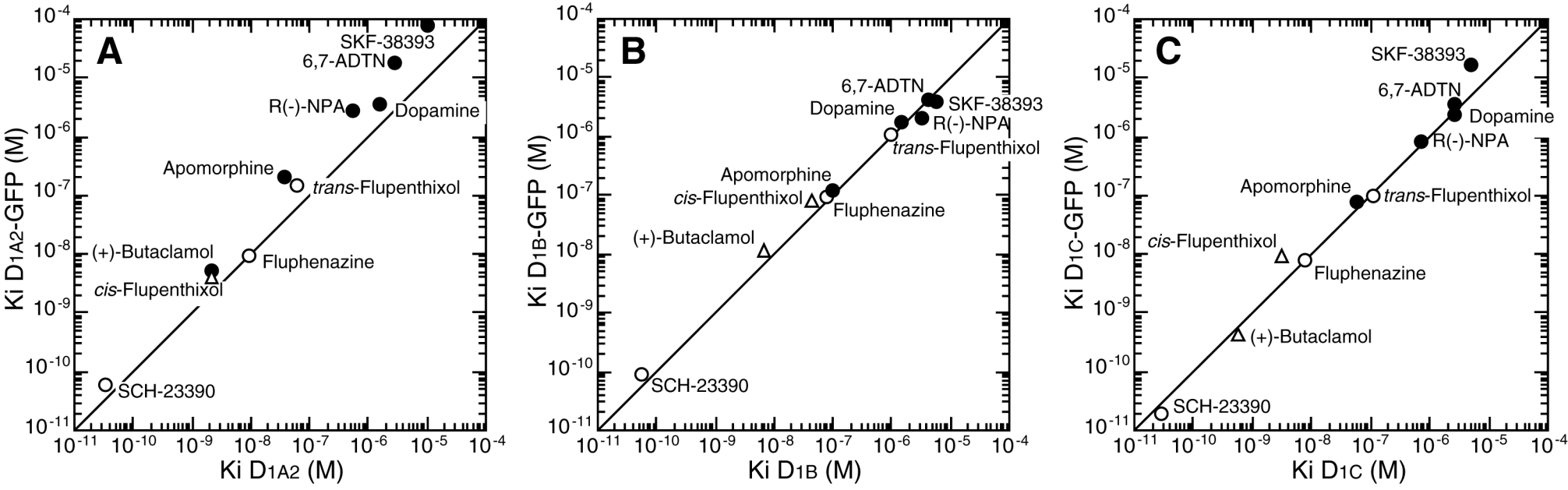

A
SKF-38393
6,7-ADTN
R(-)-NPA
Dopamine
Apomorphine
trans-Flupenthixol
(+)-Butaclamol
Fluphenazine
cis-Flupenthixol
SCH-23390
Ki D1A2-GFP (M)
Ki D1A2 (M)
B
6,7-ADTN
Dopamine
SKF-38393
R(-)-NPA
trans-Flupenthixol
Apomorphine
cis-Flupenthixol
Fluphenazine
(+)-Butaclamol
SCH-23390
Ki D1B-GFP (M)
Ki D1B (M)
C
SKF-38393
6,7-ADTN
Dopamine
R(-)-NPA
Apomorphine
trans-Flupenthixol
cis-Flupenthixol
Fluphenazine
(+)-Butaclamol
SCH-23390
Ki D1C-GFP (M)
Ki D1C (M)

Figure 2

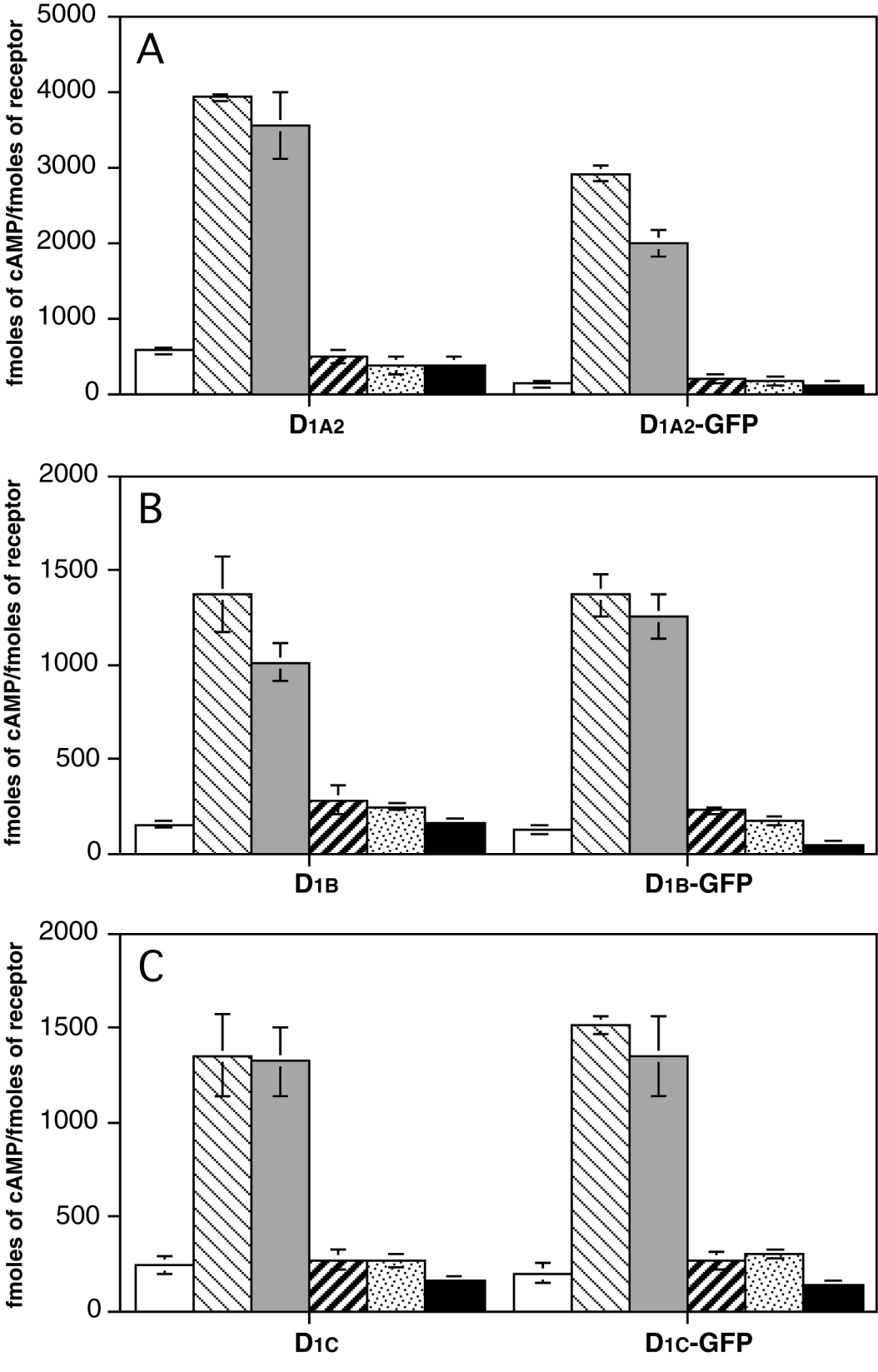

A
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
5000
4000
3000
2000
1000
0
D1A2
D1A2-GFP
B
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
2000
1500
1000
500
0
D1B
D1B-GFP
C
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
2000
1500
1000
500
0
D1C
D1C-GFP

Figure 3

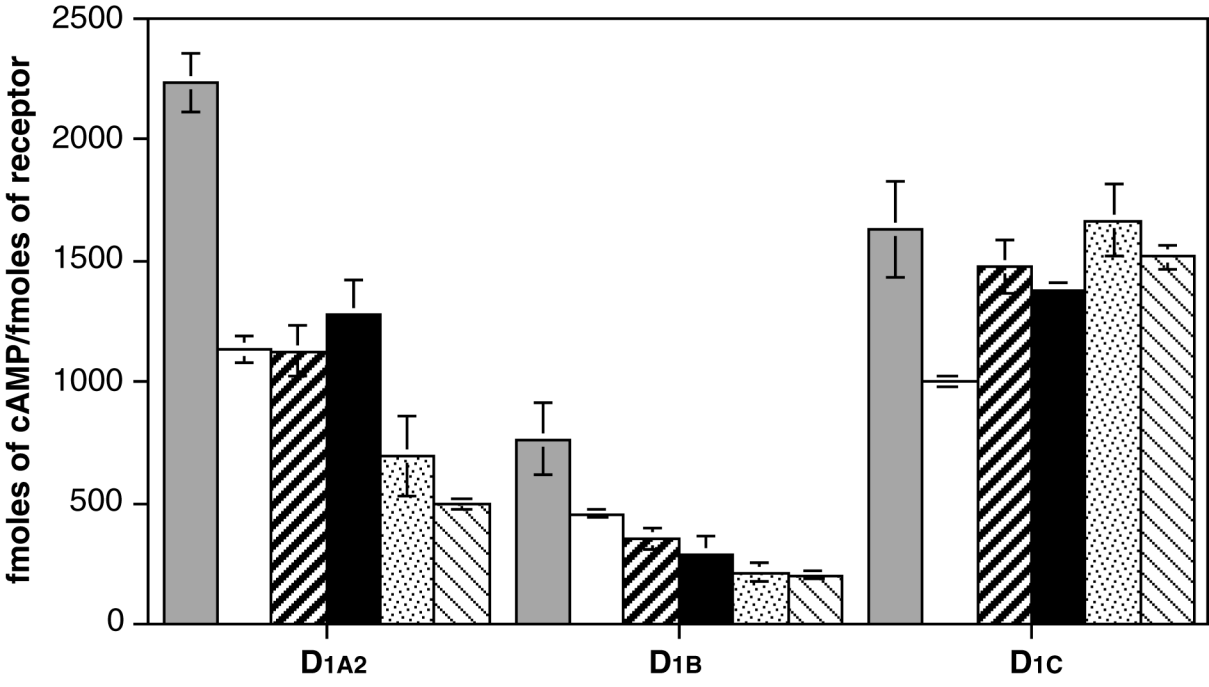
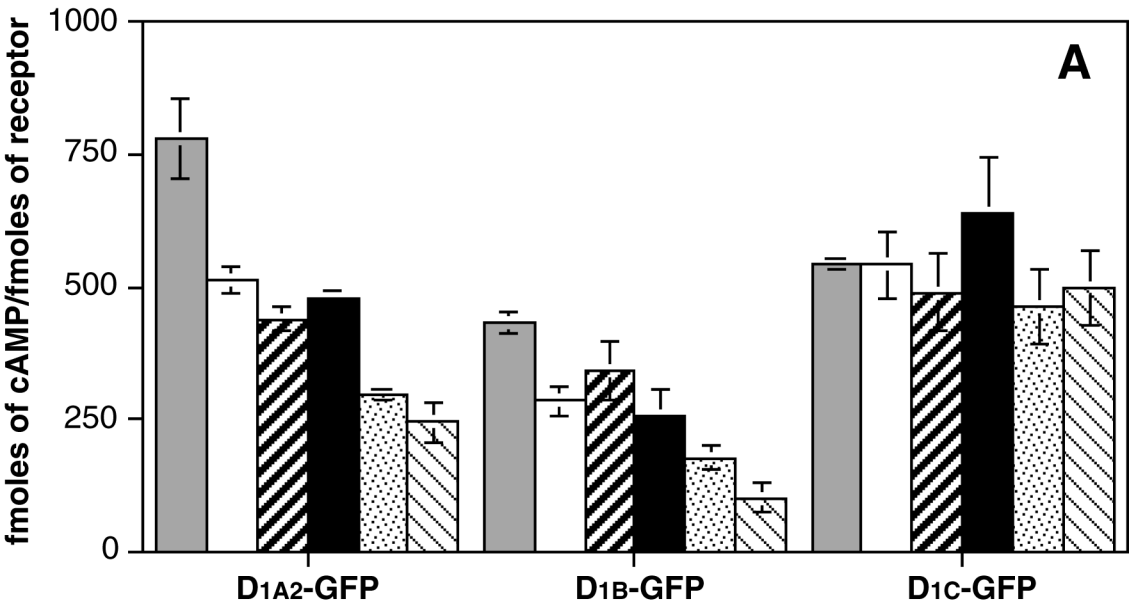

2500
2000
1500
1000
500
0
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
D1A2
D1B
D1C

Figure 4


A
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
1000
750
500
250
0
D1A2-GFP
D1B-GFP
D1C-GFP

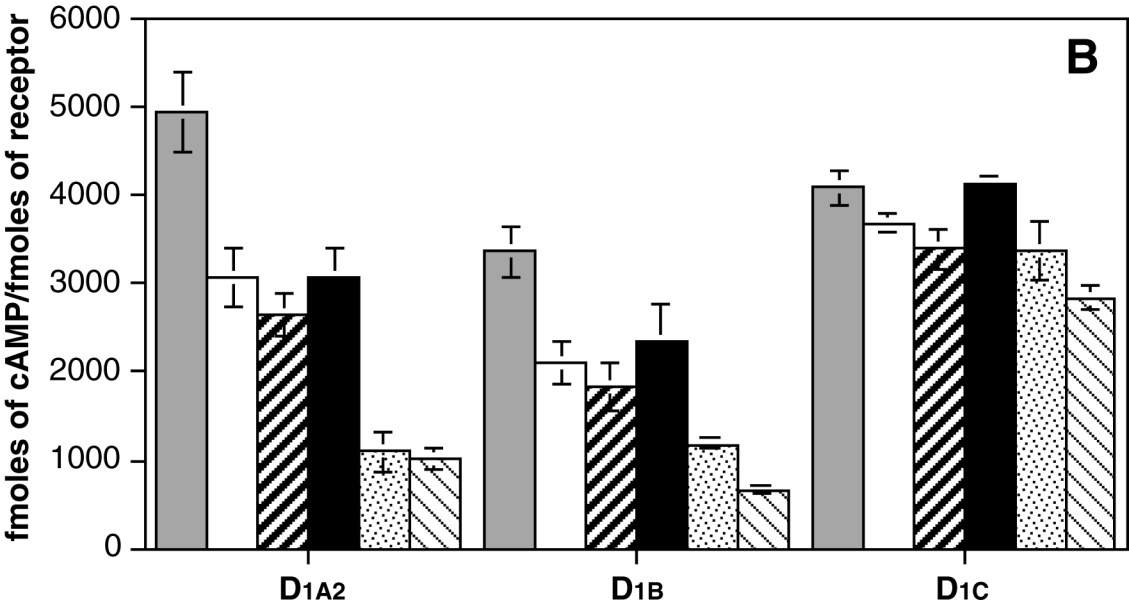

B
fmoles of cAMP/fmoles of receptor
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
D1A2
D1B
D1C

Figure 5

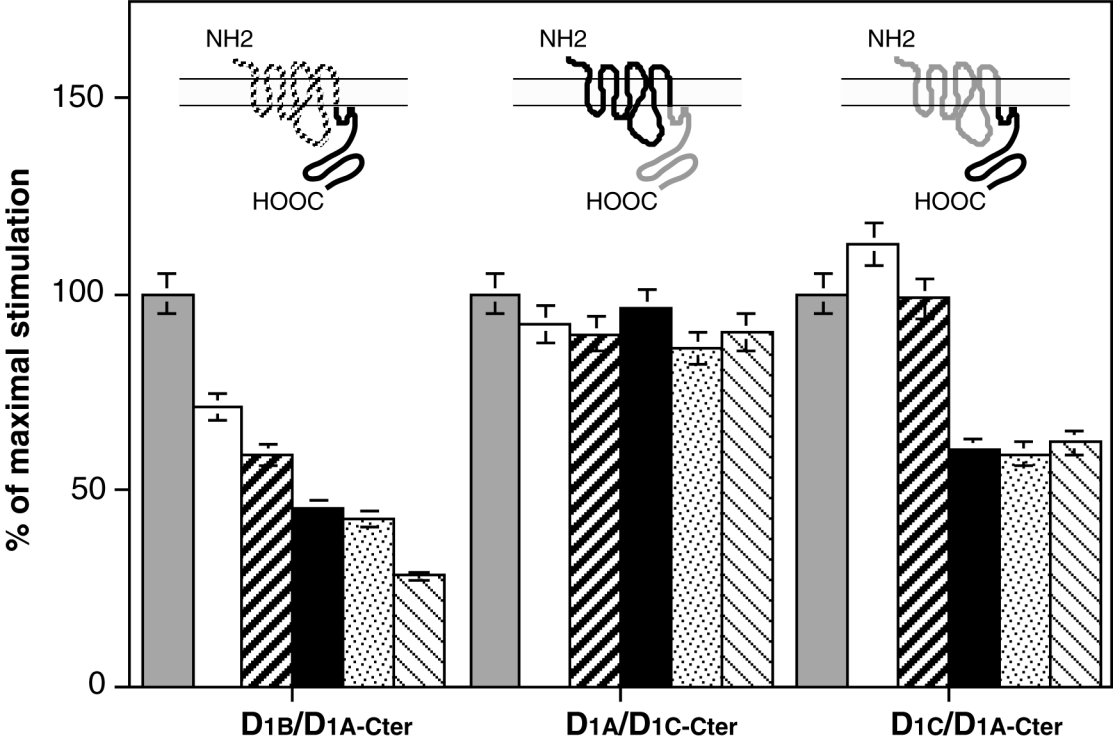

NH2
HOOC
NH2
HOOC
NH2
HOOC
150
100
50
0
% of maximal stimulation
D1B/D1A-Cter
D1A/D1C-Cter
D1C/D1A-Cter

Figure 6

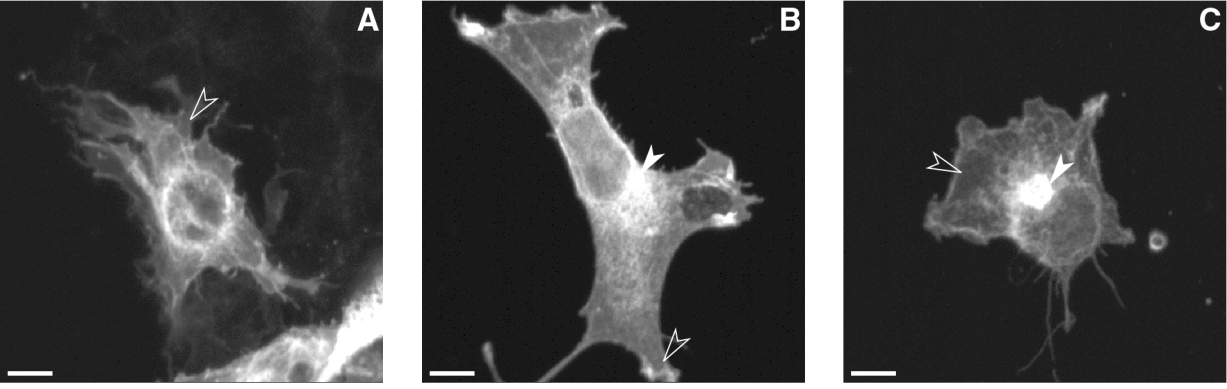


Figure 7

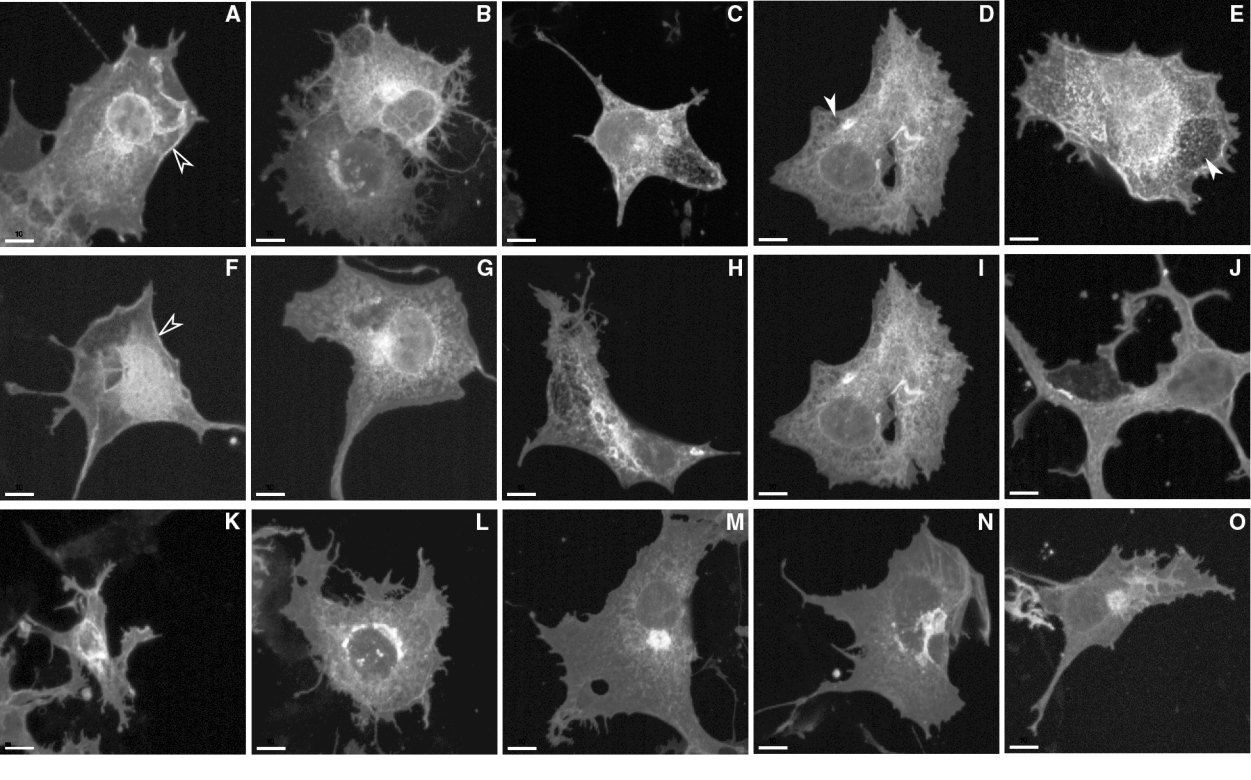


Figure 8

L'action de la dopamine dans les cellules est transmise par sa fixation sur des récepteurs qui appartiennent à deux classes, D_1 et D_2. Quatre sous-types du récepteur D_1 (D_{1A}, D_{1B}/D_5, D_{1C} et D_{1D}) ont été clonés jusqu'à présent chez les vertébrés. L'analyse évolutive montre que les sous-types D_{1A} et D_{1B} sont les plus conservés alors que les sous-types D_{1C} et D_{1D} sont absents chez les mammifères. Malgré cette diversité, les fonctions de la dopamine dans l'organisme ne peuvent pas être rapportées à l'action d'un sous-type précis. C'est pourquoi au cours de ce travail nous avons identifié des caractères fonctionnels capables de distinguer chacun des sous-types et de comprendre pour quelle raison ils ont été conservés chez les vertébrés.

La désensibilisation est un des paramètres fonctionnels les plus important. Le récepteur D_{1A} se caractérise par une baisse d'activité forte et biphasique, le récepteur D_{1B} par un profil proche avec une amplitude plus faible conséquence de son activité constitutive. Enfin, le récepteur D_{1C} ne semble pas être capable de se désensibiliser. La construction de chimères entre chacun des sous-types du récepteur D_1 et la protéine GFP ont permis la visualisation des récepteurs au cours de la désensibilisation. Elles montrent que l'internalisation ne semble pas, pour les récepteurs D_1 de la dopamine, intervenir dans le processus de désensibilisation fonctionnelle. L'activation simultanée des récepteurs A_1 de l'adénosine bloque l'activité des récepteurs D_1. L'analyse des voies de signalisation MAPK a montré que l'activation de la voie ERK était rapide et forte, et différente selon les sous-types. La voie p38 n'est que faiblement activée et la voie JNK semble ne pas l'être du tout.

Il semble donc que les mécanismes d'activation et de régulation des voies de signalisation différencient les sous-types du récepteur D_1 chez les vertébrés. Ces paramètres participent de façon majeure à la transmission régulée des fonctions de la dopamine dans l'organisme.

Dopamine effect is transmitted by its fixation on receptors that belong to two classes D_1 and D_2. Four D_1 receptor subtypes (D_{1A}, D_{1B}/D_5, D_{1C} and D_{1D}) were cloned until today in vertebrates. Evolutive analysis shows that D_{1A} and D_{1B} subtypes are the most conserved while D_{1C} and D_{1D} subtypes are missing in mammals. Despite this diversity, dopamine function in the whole organism cannot be assigned to one specific subtype action. For this reason, all along this work we have identified functional characters which may discriminate each of the subtypes and which help to understand why they were conserved in vertebrates.

Desensitisation is one of the most important functional parameter of receptor cell biology. The D_{1A} receptor desensitisation is characterised by a strong and biphasic decrease in activity. The D_{1B} receptor exhibit a similar profile with a weaker amplitude due to its constitutive activity. The D_{1C} receptor does not undergo any desensitisation. Construction of chimerical proteins between each of the D_1 receptor subtypes and the GFP fluorescent protein allowed us to visualised the receptor during the desensitisation process. It shows that internalisation, of the D_1 dopamine receptor does not occur in conjonction with the general process of desensitisation. These phenomenon are blurred by interaction with the A_1 adenosine receptor. To conclude, the analysis of MAPK signalisation pathways show that ERK activation was fast and strong and differentiate each subtypes of the subtypes. Moreover, if the p38 pathway was only weakly activated, the JNK one does not show any activity.

Thus, it appears so that differential activation and regulation of signalisation pathway discriminate D_1 dopamine receptor subtypes in vertebrates. These parameters participate to the regulated transmission of dopamine functions in the whole organism.