



HAL
open science

Activité constitutive et adressage axonal du récepteur cannabinoïque neuronal CB1

Christophe Leterrier

► **To cite this version:**

Christophe Leterrier. Activité constitutive et adressage axonal du récepteur cannabinoïque neuronal CB1. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-00250338

HAL Id: tel-00250338

<https://theses.hal.science/tel-00250338v1>

Submitted on 11 Feb 2008

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité :

NEUROSCIENCES

Présentée par :

CHRISTOPHE LETERRIER

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

**ACTIVITÉ CONSTITUTIVE ET ADRESSAGE AXONAL DU RÉCEPTEUR
CANNABINOÏQUE NEURONAL CB₁**

Thèse dirigée par :

Pr. Jean Rossier

Thèse soutenue le 17 mars 2006 devant le jury composé de :

Pr. François Couraud	Examineur
Pr. Michel Hamon	Examineur
Dr. Bénédicte Dargent	Rapporteur
Dr. Thierry Galli	Rapporteur
Pr. Jean Rossier	Examineur
Dr. Zsolt Lenkei	Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier Zsolt Lenkei. Au long de mes cinq ans de travail en tant que stagiaire, étudiant de DEA, puis thésard, il m'a communiqué sa passion pour la recherche, son goût pour la discussion à bâtons rompus. Les méthodes innovantes, l'utilisation intensive de l'imagerie et de la quantification, les concepts alliant la pharmacologie la plus pointue et la biologie cellulaire la plus touffue, l'importance accordée à la pertinence physiologique des résultats : tout ce qui fait l'essence et l'originalité de ce travail, il l'a initié, suivi et développé, avec une passion et une attention sans failles.

Merci à Jean Rossier pour nous avoir raconté la Biologie dès la première année à l'ESPCI, puis pour avoir défendu mon choix de rejoindre son laboratoire. Je tiens à insister sur son accueil, son soutien, l'enthousiasme et l'énergie qu'il dépense chaque jour pour développer et maintenir l'environnement d'une recherche scientifique audacieuse.

Merci à Bénédicte Dargent d'avoir accepté d'être rapporteur, et merci surtout de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son laboratoire pour parfaire ma formation scientifique : j'espère pouvoir bientôt apprécier la vitalité des neurones marseillais. Je remercie également Thierry Galli d'avoir lui aussi accepté d'être rapporteur de mon travail : ses remarques m'ont permis d'améliorer considérablement ce manuscrit. Merci à Michel Hamon, qui par son rôle d'examineur apportera son expertise et son jugement de pharmacologiste chevronné. Je remercie également François Couraud, c'est un plaisir et un honneur de le compter au nombre des examinateurs de cette thèse.

Dans l'Équipe Dynamique des Récepteurs Neuronaux, je tiens à remercier tous ceux avec qui j'ai apprécié partager les idées, les astuces, les joies, les galères et les paillasses : j'espère que vous, Damien et Marc, continuerez votre carrière selon vos goûts et vos souhaits. J'espère aussi avoir réussi à transmettre les techniques et le plaisir du jardinage de la culture de neurones à Anne, qu'elle puisse à son tour explorer ce modèle fascinant et conduire ses projets ambitieux vers le succès. Merci aussi à tous les étudiants qui sont venus découvrir ou approfondir leur goût de la recherche avec nous : Caroline, Manuel, Benjamin, Sébastien et Sonia, tous les élèves de l'ESPCI pour des projets de troisième année ou pour un stage d'été.

Merci à tous les membres du laboratoire de Neurobiologie présents et passés pour leur accueil, leur aide et leur collaboration, en particulier Marie-Claude pour ses conseils, Randal le compagnon de labo du dimanche, Fabien l'homme-orchestre, Vincent et son setup de cleptomane optique. Je remercie Hélène, Bruno, Luce, Jack, Bernard, Thierry, Tania et Bertrand qui à un moment ou à un autre ont su conseiller, dépanner, inspirer, arranger. Il y avait aussi les voisins de Genescore, Luc, Fabrice, Florence, Cathy et Diane, bon courage à vous tous, à Nantes ou ailleurs. Un grand merci à Marcel, Sylvie, Magali pour leur disponibilité et leur efficacité de tous les jours.

Merci à tous ceux qui ont collaboré à ce travail : Jeanne Lainé qui a apporté une contribution décisive à l'étude du récepteur CB1 grâce à son efficacité, sa gentillesse et son œil électronique entraîné ; Hélène Boudin, Michèle Darmon et Boris Emerit qui m'ont

enseigné la culture des neurones capricieux. Une pensée reconnaissante pour Damien Carrel et Alice Meunier et leurs trafics de glies du lundi, Sabine Bardin et ses cellules HEK toujours en forme, Révital Aflalo et ses images bizarres, Benoît Dubertret et Alexandra Fragola pour les quantum dots magiques. Merci à tous les pros de Curie qui m'ont ouvert leurs armoires, leurs frigos, voire leur salle de microscopie et leurs soirées arrosées : Manuel Thery et Michel Bornens pour leur microscope « 3D », Stéphanie Miserey-Lenkei et Juliette Azimzadeh pour l'anticorps ou le plasmide qui sauve la manip.

Je n'oublie pas les personnes que j'ai rencontrées pendant mes années d'études, professeurs et camarades, les anciens combattants du cours Pasteur, JB, Rudy, Virginie et Cédric, que les résultats incroyables et les publications brillantes pleuvent sur vous.

Autour du travail, ce sont aussi les déjeuners et les pauses et le reste, ce sont les discussions et les apéros avec Damien, Manuel et Nico, où l'on peut râler et se remotiver entre deux manips à oublier, ce sont les petits fours du SDH en sortant du labo, les plans Diam's avec Hugo, les conversations avec DDB. Enfin, c'est la présence de Mélanie à mes côtés, pour me motiver, ou me distraire, ou me rassurer, ou me choyer, ou me relire.

Qu'ils soient tous remerciés, que leur vie soit douce et heureuse.

RÉSUMÉ

L'activité constitutive est une propriété pharmacologique que possèdent de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cependant, la pertinence de ce phénomène *in vivo* ainsi que son rôle biologique restent largement inconnus. Nous avons étudié les relations entre la pharmacologie et le trafic intracellulaire du récepteur cannabinoïque CB1, un des RCPG les plus abondamment exprimés dans le cerveau. Ce récepteur est présent dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, les noyaux de la base et le cervelet. Au niveau subcellulaire, le récepteur CB1 est localisé à la surface des axones et dans des vésicules somatodendritiques intracellulaires. Pharmacologiquement, le récepteur CB1 possède une activité constitutive avérée. Nous avons examiné le trafic intracellulaire du récepteur CB1, exprimé sous forme de protéine fusion CB1-eGFP dans les cellules HEK-293. L'activité constitutive du récepteur CB1 provoque un cycle continu d'endocytose et de recyclage du récepteur entre la membrane plasmique et les endosomes intracellulaires : à l'équilibre, le récepteur CB1 est majoritairement présent dans les endosomes. Le cycle fait intervenir une endocytose par puits recouverts de clathrine et un trafic intracellulaire dépendant de Rab5 et de Rab4, mais pas de Rab11. Dans les neurones d'hippocampe en culture, ce cycle d'endocytose/recyclage du récepteur CB1 est limité au compartiment somatodendritique, car le récepteur est stable à la surface de l'axone. Ce cycle dépend de l'activité constitutive du récepteur CB1 et l'endocytose sélective du récepteur CB1 dirige l'établissement de l'expression axonale du récepteur à la surface du neurone. A partir de ce premier exemple d'adressage axonal médié par un cycle endocytique dépendant de l'activité constitutive, nous proposons un modèle d'adressage pour les RCPG neuronaux, basé sur leurs caractéristiques pharmacologiques.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	2
Résumé.....	4
Table des matières.....	5
Table des figures.....	9
Introduction.....	11
1 Présentation.....	11
2 Les récepteurs couplés aux protéines G.....	12
2.1 Introduction.....	12
2.2 Présentation des R7TM/RCPG.....	12
2.2.1 Les quatre familles de R7TM.....	13
2.2.2 Récepteurs orphelins : ligand inconnu.....	15
2.2.3 Structure des RCPG : rhodopsine.....	15
2.3 Activation et signalisation des RCPG.....	17
2.3.1 Cycle des protéines G.....	18
2.3.2 Partenaires du cycle des protéines G.....	19
2.3.3 Protéines partenaires des GPCR autres que les protéines G.....	19
2.4 Pharmacologie des R7TM et activité constitutive.....	20
2.4.1 Modèle à deux états de l'activité d'un récepteur.....	20
2.4.2 Activité constitutive et agonistes inverses.....	20
2.4.3 Extensions du modèle : ternaire et ternaire étendu.....	22
2.4.4 Modèles complexes : hypercubes et micro-états.....	22
2.4.5 Détection et pertinence de l'activité constitutive des RCPG.....	24
2.5 Endocytose des RCPG après activation.....	26
3 Endocytose et trafic intracellulaire.....	28
3.1 Présentation : les différents types d'endocytose.....	28
3.1.1 Mécanismes de l'endocytose : rôle de la clathrine.....	29
3.1.2 Les compartiments endosomaux : anatomie.....	30
3.1.3 Biologie moléculaire de l'endocytose.....	31
3.1.4 Déterminants moléculaires du système endosomal.....	33
3.2 Régulation et trafic intracellulaire des RCPG.....	36
3.2.1 Présentation de l'endocytose des RCPG.....	36
3.2.2 Désensibilisation à court terme.....	37
3.2.3 Désensibilisation hétérologue et homologue.....	37
3.2.4 Les G-protein coupled Receptor Kinases (GRK).....	38
3.2.5 Autres protéines impliquées dans la phosphorylation des RCPG.....	38
3.2.6 Les arrestines ou β -arrestines.....	38
3.2.7 L'endocytose des RCPG.....	39
3.2.8 Trafic intracellulaire après endocytose.....	39
3.2.9 Déterminants moléculaires du tri postendocytique.....	40
4 Le récepteur cannabinoïque CB1.....	43
4.1 Historique.....	43

4.2	Biologie moléculaire de CB1	43
4.2.1	Phylogénie et structure génétique	43
4.2.2	Récepteur CB2 et récepteur putatif "CB3"	44
4.3	Distribution de CB1	45
4.3.1	Autoradiographie	45
4.3.2	Hybridation <i>in situ</i>	46
4.3.3	Immunocytochimie	47
4.4	Ligands de CB1	48
4.4.1	Cannabinoïdes classiques.....	48
4.4.2	Cannabinoïdes non classiques.....	48
4.4.3	Aminoalkylindoles	48
4.4.4	Cannabinoïdes endogènes et leurs dérivés : eicosanoïdes	48
4.4.5	Antagonistes du récepteur CB1.....	49
4.5	Essais d'activité pour CB1	50
4.5.1	Effets <i>in vivo</i>	50
4.5.2	Essais <i>in vitro</i>	51
4.6	Voies de signalisation de CB1	51
4.6.1	Régulation de l'adénylate cyclase (AC).....	52
4.6.2	Régulation des canaux ioniques.....	52
4.6.3	Régulation du calcium intracellulaire	52
4.6.4	Régulation des MAP kinases et du céramide.....	53
4.6.5	Régulation des gènes immédiats précoces et de la synthèse protéique.....	53
4.6.6	Régulation de la <i>Nitric Oxyde Synthase</i> (NOS).....	54
4.7	Rôles de CB1	55
4.7.1	Neurotransmission	55
4.7.2	DSI et DSE.....	55
4.7.3	Douleur.....	57
4.7.4	Neuroprotection & excitotoxicité.....	58
4.7.5	Addiction.....	58
4.7.6	Prise de nourriture.....	58
4.8	Activité constitutive du récepteur CB1	59
4.8.1	Effets cannabinoïde inverse <i>in vivo</i>	59
4.8.2	Effets cannabinoïde inverse <i>ex vivo</i>	61
4.8.3	Effets cannabinoïde inverse <i>in vitro</i>	61
4.8.4	Agonistes endogènes ou activité constitutive ?.....	61
4.9	Interactions moléculaires et trafic intracellulaire du récepteur CB1.....	62
4.9.1	Activation et couplage aux protéines G	62
4.9.2	Endocytose du récepteur CB1	63
Résultats	67
1	Trafic intracellulaire du récepteur CB1	67
1.1	Introduction : trafic des récepteurs constitutivement actifs	67
1.1.1	Récepteurs retenus dans le RE.....	67
1.1.2	Désensibilisation constitutive	68
1.1.3	Déstabilisation de récepteurs constitutivement actifs	68
1.1.4	Translocation des récepteurs constitutivement actifs.....	69
1.1.5	Questions posées	70
1.1.6	Méthodes : la <i>Single Cell Optical Pharmacology</i> (SCOP).....	72
1.2	Résultats	73
1.2.1	Distribution et dynamique de CB1-eGFP	73
1.2.2	Translocations induites par les ligands de CB1	74

1.2.3	Endocytose constitutive et rôle du recyclage.....	74
1.2.4	Rôle des protéines Rab dans le transport du récepteur CB1.....	75
1.3	Article 1: “Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor”.....	75
1.4	Discussion.....	85
1.4.1	Principaux résultats.....	85
1.4.2	Mécanisme d’endocytose et trafic intracellulaire.....	85
1.4.3	Cycle de trafic d’un RCPG constitutivement actif.....	88
1.4.4	Le cycle endocytique comme modulateur de la présence à la membrane.....	92
2	Activité constitutive et adressage axonal du récepteur CB1.....	95
2.1	Introduction : polarité et trafic neuronal.....	95
2.1.1	Les neurones : cellules polarisées.....	95
2.1.2	La culture de neurones embryonnaires d’hippocampe de rat.....	95
2.1.3	Développement et maintien de la polarité neuronale.....	98
2.1.4	Modes d’adressage des protéines membranaires.....	100
2.1.5	Adressage des RCPG et du récepteur CB1.....	104
2.1.6	Questions posées.....	105
2.2	Résultats.....	106
2.2.1	Distribution de CB1 dans les neurones en culture.....	106
2.2.2	Distribution de FCB1-eGFP dans les neurones en culture.....	107
2.2.3	Endocytose constitutive dans le compartiment somatodendritique.....	107
2.2.4	Pharmacologie et trafic du récepteur endogène.....	108
2.2.5	Pharmacologie et trafic du récepteur FCB1-eGFP.....	108
2.2.6	Effet de l’endocytose constitutive sur l’adressage axonal de CB1.....	109
2.2.7	Étude cinétique de la distribution membranaire du récepteur.....	110
2.3	Article 2: “Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of CB1 cannabinoid receptor”.....	111
2.4	Discussion.....	130
2.4.1	Récepteur CB1 et sous-types neuronaux.....	130
2.4.2	CB1 : récepteur présynaptique ou axonal ?.....	131
2.4.3	Activité constitutive des récepteurs dans l’axone.....	132
2.4.4	Endocytose sélective : capacité d’endocytose moindre de l’axone ?.....	133
2.4.5	Généralisation du modèle d’adressage par activation constitutive.....	134
2.4.6	Généralisation du modèle : cas du récepteur 5-HT _{1B}	137
Conclusions et perspectives.....		141
1	Interprétations.....	141
1.1	Principaux résultats.....	141
1.2	Particularité des récepteurs axonaux.....	142
2	Perspectives.....	143
2.1	Directions de recherche.....	143
2.2	Étude des déterminants du trafic de CB1.....	143
2.3	Que se passe-t-il dans l’axone ?.....	145
2.4	État d’activation.....	145
2.5	Signalisation axonale.....	146
2.6	Phosphorylation et désensibilisation.....	147
2.7	Rôles du récepteur CB1 axonal.....	147
Annexes méthodologiques.....		149
1	Culture des neurones d’hippocampe embryonnaire de rat.....	149
1.1	Culture de cellules gliales de cortex de rats nouveau-nés.....	149
1.1.1	Milieux.....	149
1.1.2	Dissection et dissociation.....	150

1.1.3	Culture.....	151
1.2	Culture des neurones d’hippocampe embryonnaires de rat	151
1.2.1	Milieux	151
1.2.2	Préparation des lamelles et du milieu (la veille).....	152
1.2.3	Dissection.....	153
1.2.4	Dissociation et dépôt.....	156
1.2.5	Culture et transfection.....	157
2	Méthodes de quantification des images	158
2.1	Distribution de CB1-eGFP dans les cellules HEK-293	158
2.2	Quantification dans les neurones	160
2.2.1	Rapport Surface/Total : translocations somatodendritiques	160
2.2.2	Rapport S/N : utilisation de NeuronJ	162
2.2.3	Rapport A/D : polarisation de l’expression de CB1	163
	Références.....	165

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires (R7TM) ou Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)	13
Figure 2 : Structure de la rhodopsine	16
Figure 3 : Voies de signalisation des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)	17
<i>Table 1 : Sous-unités des protéines G trimériques</i>	18
Figure 4 : Cycle des protéines G trimériques	19
Figure 5 : Activité constitutive	21
Figure 6 : Modélisation pharmacologique des RCPG	23
<i>Table 2 : Médicaments ayant une activité agoniste inverse sur un RCPG</i>	25
<i>Table 3 : Activité constitutive de RCPG mutants et pathologies associées</i>	26
Figure 7 : Types d'endocytose cellulaire	29
Figure 8 : Mécanismes de l'endocytose médiée par la clathrine	32
Figure 9 : Mécanismes de l'action des GTPases Rab et Arf	35
Figure 10 : Anatomie des compartiments endosomaux	36
Figure 11 : Désensibilisation et trafic intracellulaire des RCPG	41
Figure 12 : Le récepteur cannabinoïque CB1	44
Figure 13 : Distribution des récepteurs CB1 dans le cerveau de rat	46
Figure 14 : Structure chimique des ligands du récepteur CB1	50
Figure 15 : Signalisation intracellulaire en aval du récepteur CB1	54
Figure 16 : Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI)	57
Figure 17 : Observations de l'effet cannabinoïde inverse	60
Figure 18 : Endocytose du récepteur CB1	64
Figure 19 : Modèles de la régulation des récepteurs CAM par un agoniste inverse	70
Article 1 : "Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor"	77 - 85
Figure 20 : Cycle constitutif d'endocytose/recyclage du récepteur CB1	86
Figure 21 : Visualisation directe du cycle endocytique	89
Figure 22 : Cycles endocytiques de RCPG constitutivement actifs	92
Figure 23 : Neurones d'hippocampe en culture	99
Figure 24 : Spécification de l'axone	101
Figure 25 : Modèles d'adressage axonal	104
Article 2 : "Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors"	115-132

Figure 26 : Modèle de cycle constitutif polarisant	139
Figure 27 : Distribution subcellulaires des récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT _{1B}	140
Figure 28 : Activité constitutive des récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT _{1B}	141
Figure 29 : Cycle constitutif d'endocytose/recyclage de 5-HT _{1B} dans les cellules HEK-293	143
Figure 30 : Dissection d'hippocampes de cerveau de rat embryonnaire (partie 1)	157
Figure 31 : Dissection d'hippocampes de cerveau de rat embryonnaire (partie 2)	158
Figure 32 : Quantification du rapport de fluorescence membranaire (MFR) pour un RCPG	162
Figure 33 : Quantification du rapport S/T pour les récepteurs FCB1-eGFP dans les neurones	164
Figure 34 : Quantification du rapport S/N pour les récepteurs CB1 endogènes	165
Figure 35 : Quantification du rapport A/D et de la polarisation de l'expression de CB1	166

INTRODUCTION

1 Présentation

Cette thèse a pour objet l'étude des relations étroites qu'entretiennent la pharmacologie et le trafic intracellulaire du récepteur cannabinoïque type I (CB1), récepteur neuronal exprimé à la surface des axones. Ce récepteur possède une forte activité constitutive, c'est-à-dire qu'il peut adopter une conformation active et provoquer une signalisation intracellulaire, même en l'absence de ligand. Cette thèse a eu pour but d'étudier les conséquences et le rôle physiologique de cette activité constitutive, en termes de trafic intracellulaire et d'adressage du récepteur CB1, considéré comme récepteur axonal modèle. Dans un premier temps, j'ai montré que cette activité constitutive provoque un cycle spontané d'endocytose et de recyclage du récepteur CB1. Exprimés dans la lignée cellulaire HEK-293 (*Human Embryo Kidney*), les récepteurs CB1 s'activent spontanément et sont continuellement internalisés de la membrane plasmique vers les endosomes, puis recyclés vers la membrane. Dans un deuxième temps, j'ai étudié la pertinence et le rôle de ce cycle dans les cellules neuronales. Dans les neurones d'hippocampe en culture, ce cycle d'endocytose et de recyclage du récepteur CB1 est présent dans le compartiment somatodendritique, mais absent dans le compartiment axonal, où le récepteur CB1 est exprimé de manière stable en surface. Ceci suggère qu'une régulation différentielle de l'endocytose du récepteur entre les compartiments axonal et somatodendritique génère une expression de surface restreinte à l'axone. L'activité constitutive du récepteur CB1 provoque donc un cycle constitutif d'endocytose/recyclage limité au compartiment somatodendritique, et génère la polarisation axonale de l'expression de surface du récepteur CB1. Partant de ces observations, nous proposons un modèle d'adressage des récepteurs axonaux dépendant de leur activité constitutive.

Ce travail s'intègre dans un ensemble de connaissances et d'enjeux qui seront détaillés dans l'introduction. Il s'agira tout d'abord de présenter la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) et leur importance biologique, en introduisant les différents concepts décrivant leur pharmacologie ; puis, les mécanismes de l'endocytose cellulaire, en particulier l'endocytose des RCPG, seront rappelés. Je présenterai ensuite le récepteur cannabinoïque CB1, sa distribution dans

le système nerveux et sa localisation subcellulaire, ainsi que son activité constitutive marquée et son trafic intracellulaire.

2 Les récepteurs couplés aux protéines G

2.1 Introduction

Dès le début du XX^e siècle, les fondateurs de la pharmacologie (Paul Ehrlich, John Langley) ont postulé l'existence de « substances réceptives » pour expliquer les effets de composés naturels ou synthétiques sur des organismes ou des organes isolés (Limbird, 2004). Durant les cinquante années suivantes, la pharmacologie et ses pionniers (Alfred Clark, Raymond Ahlquist, Steve Stephenson) se sont attaché à décrire les relations entre les composés appliqués et leurs effets physiologiques grâce aux concepts de couple récepteur-ligand, d'occupation et d'efficacité (Maehle et al., 2002). Cependant, le « récepteur » reste une entité pharmacologique abstraite jusque dans les années 1960. Les progrès de la biochimie permettent alors la purification de protéines impliquées, la mise en évidence d'effecteurs et de second messagers (protéine G, adénosine monophosphate cyclique AMPc), puis la détection directe des récepteurs à l'aide de ligands radiomarqués (Lefkowitz, 2004). En 1986, le clonage du premier récepteur couplé aux protéines G, le récepteur aux catécholamines β_2 adrénergique (β_2 AR) (Dixon et al., 1986), dévoile son étonnante similarité structurelle avec la rhodopsine, un récepteur permettant de détecter la lumière dans les cellules rétiniennes : ces deux récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires.

2.2 Présentation des R7TM/RCPG

Un Récepteur à 7 Domaines Transmembranaires (R7TM) est une protéine comportant sept hélices transmembranaires qui peut lier un composé (appelé ligand) présent dans le milieu extracellulaire, ce qui provoque l'activation de voies de signalisation intracellulaires impliquant le plus souvent des protéines G trimériques, d'où leur autre nom de Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG ou GPCR en anglais, **Figure 1A**). À partir de la prédiction de cette structure heptahélicale, environ 800 R7TM ont été identifiés dans le génome humain (Foord et al., 2005). C'est la plus grande superfamille de gènes connue puisqu'elle comprend plus de 3 % de l'ensemble des gènes présents chez l'homme (Fredriksson et al., 2003). Parmi ces récepteurs, on distingue environ 500 récepteurs chimiosensoriels qui détectent la présence de substances extérieures : lumière, odorants, phéromones, goûts, et environ 300 récepteurs qui détectent des molécules produites par l'organisme : peptides, lipides, neurotransmetteurs, nucléotides. Les R7TM peuvent

donc interagir avec une très grande diversité de ligands et interviennent dans toutes les grandes fonctions de l'organisme : le système sensoriel (vision, odorat, goût), la régulation hormonale, la transmission nerveuse, la prolifération cellulaire, le développement... On estime que 80 % des hormones et des neurotransmetteurs connus sont actifs par le biais d'un R7TM (Birnbaumer et al., 1990). Les R7TM permettent à la cellule de réagir à la présence d'un ligand donné dans l'environnement extracellulaire : ce rôle de transducteur place les R7TM comme des cibles thérapeutiques par excellence. La moitié des médicaments commercialisés dans le monde (Howard et al., 2001), dont 30 % des 50 médicaments les plus vendus (Chalmers and Behan, 2002), ont pour cible un système R7TM-ligand ou sa machinerie de régulation.

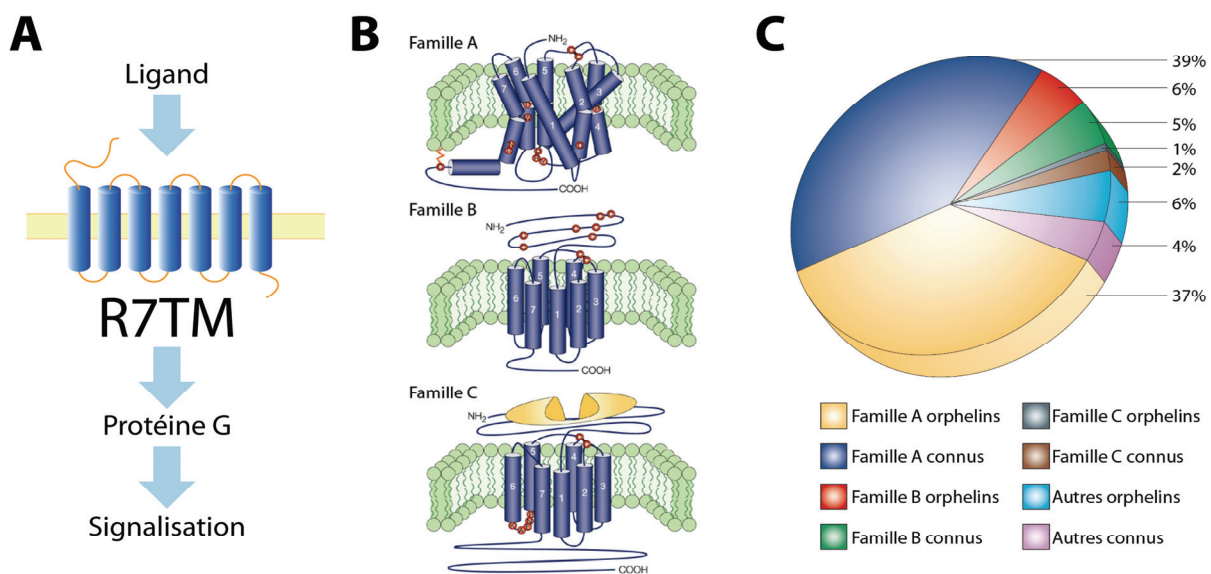


Figure 1 : Les Récepteurs à Sept Domaines Transmembranaires (R7TM) ou Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

A/ Le récepteur est un transducteur qui réagit à la présence d'un ligand extracellulaire en activant des voies de signalisations intracellulaires par le biais de protéines G.

B/ Structure des trois familles principales de R7TM : tous les R7TM possèdent sept domaines transmembranaires, la classification se faisant selon la taille de la queue aminoterminal, le type de ligand et la localisation de son site de liaison (d'après George et al., 2002).

C/ Répartition des récepteurs à ligand connu ou orphelins dans familles phylogéniques (d'après Chalmers and Behan, 2002). Environ la moitié des RCPG putatifs sont encore orphelins.

2.2.1 Les quatre familles de R7TM

À partir de la détection des gènes codant pour des protéines à sept domaines transmembranaires, les études phylogéniques permettent de classer les R7TM mammaliens en plusieurs familles qui se différencient selon le type et le lieu de fixation de leur ligand (Pierce et al., 2002) (**Figure 1B**).

La famille A, de loin la plus nombreuse, inclut de nombreux récepteurs et peut être subdivisée en plusieurs types :

- les opsines sont des récepteurs visuels dont le représentant le plus étudié est la rhodopsine. Ces récepteurs possèdent la particularité de contenir un ligand cryptique, le rétinal. Sous l'action de photons lumineux, cette partie de la protéine change de conformation, ce qui provoque l'activation du récepteur ;
- les récepteurs des molécules odorantes constituent la classe la plus nombreuse. Elle compte plusieurs milliers de gènes chez les rongeurs contre environ 500 chez l'homme ;
- les récepteurs de petites molécules endogènes (c'est-à-dire fabriquées par l'organisme) peuvent lier des molécules diverses : amines biogéniques, acides aminés, prostanoïdes, nucléosides et nucléotides, phospholipides, acides gras. Le ligand se lie de manière non covalente au sein du réceptacle formé par l'arrangement extracellulaire des sept hélices transmembranaires du récepteur ;
- les récepteurs peptidiques interagissent avec des hormones, des neurotransmetteurs ou des substances paracrines. Dans ce cas, les boucles extracellulaires participent également au processus de liaison de ces ligands plus massifs ;
- les récepteurs à motif LRR (*Leucine Rich Repeat*), appelés *LRR-containing GPCR* (LGR), possèdent une longue queue aminoterminal (350-500 aa). Ce sont des récepteurs de glycoprotéines : *Luteinizing Hormone* (LH), *Chorionic Gonadotropin* (CG), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) et *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) ;
- les récepteurs activés par une protéase (*Protease Activating Receptors* PAR) sont activés par un mécanisme protéolytique. Une protéase (thrombine, sérine protéase) clive la queue aminoterminal, la nouvelle extrémité exposée constituant le ligand qui active le récepteur.

Les récepteurs de la famille B ont pour ligand des peptides de la famille des hormones et peptides gastro-intestinaux. Ils possèdent une longue queue aminoterminal (120 acides aminés) contenant un motif HBD (*Hormone Binding Domain*). Citons par exemple les récepteurs à l'hormone parathyroïde (PTH), le glucagon, le PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*), et la nouvelle famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires de famille B à longue queue aminoterminal (LNB-7TM). Les LNB-7TM sont activés par des molécules d'adhésion (Kreienkamp, 2002). Les récepteurs *Frizzled* et *Smoothed*, qui ont pour ligand les Wnts, peuvent également être classés dans cette famille ;

La famille C regroupe des récepteurs comportant une large boucle extracellulaire (*Venus Flytrap Module*) : récepteurs du glutamate (récepteurs métabotropiques mGluRs), récepteur

GABA_B et récepteur sensible au calcium CaR. Ces récepteurs sont souvent des hétérodimères constitués de deux sous-unités (Pin et al., 2003).

La famille D regroupe certains récepteurs aux phéromones détectées par l'organe vasoméronasal, famille très nombreuse chez les rongeurs mais constituée surtout de pseudo-gènes chez l'homme.

2.2.2 Récepteurs orphelins : ligand inconnu

De nombreux R7TM n'ont été détectés qu'à partir de la prédiction des domaines transmembranaires présents dans leur séquence, et ne sont pas encore caractérisés fonctionnellement. Le ligand activant ces récepteurs, qu'il soit endogène ou provenant de l'extérieur, n'est pas connu. Cela leur vaut l'appellation de « récepteurs orphelins » (Civelli et al., 2005) : environ la moitié des récepteurs détectés par analyse génétique sont orphelins (George et al., 2002) (**Figure 1C**). Dans le domaine de la recherche de substances thérapeutiques, cette situation a inspiré la technique de « pharmacologie inverse », consistant à partir de la cible (le récepteur) pour trouver le ligand correspondant : des banques de substances synthétiques ou d'extraits naturels sont criblées en mesurant la signalisation de systèmes cellulaires exprimant des récepteurs orphelins définis. Cette stratégie est particulièrement pertinente en neurobiologie, le cerveau exprimant 90 % des RCPG connus (Vassilatis et al., 2003). Elle a d'ores et déjà conduit à la découverte de nouveaux systèmes de régulation neuropeptidiques comme les orexines/hypocrétines qui jouent un rôle dans le cycle veille/sommeil, le système nociceptine/orphanine, la ghréline et l'apéline (Civelli et al., 2001).

2.2.3 Structure des RCPG : rhodopsine

La structure tertiaire d'un RCPG est la suivante (**Figure 2A**) : queue aminoterminal extracellulaire, domaine transmembranaire comportant sept hélices qui traversent la membrane (Hargrave and McDowell, 1992) et sont aisément détectables sur un profil d'hydrophobicité (**Figure 2B**), et partie carboxyterminale intracellulaire. L'arrangement spatial des hélices est ici représenté pour la rhodopsine, seul RCPG dont la structure a été explicitée par cristallographie (Palczewski et al., 2000) : les hélices sont plus ou moins inclinées par rapport au plan de la membrane plasmique, et s'organisent en cylindre (**Figure 2C**). Les récepteurs peuvent également comporter des ponts disulfures entre les boucles extracellulaires, notamment entre la première et la seconde boucle. Ils sont en outre la cible de modifications post-traductionnelles : glycosylations sur les parties aminoterminal et carboxyterminale, ou palmitoylations permettant un ancrage de la queue carboxyterminale dans la membrane plasmique.

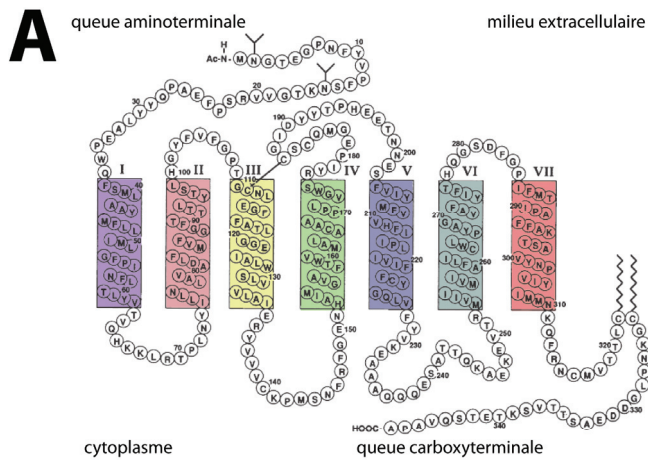
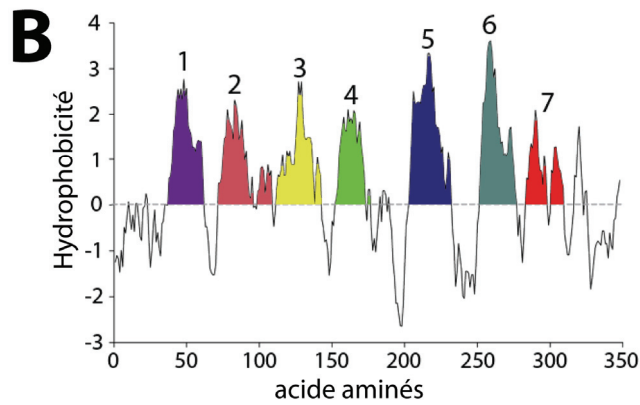
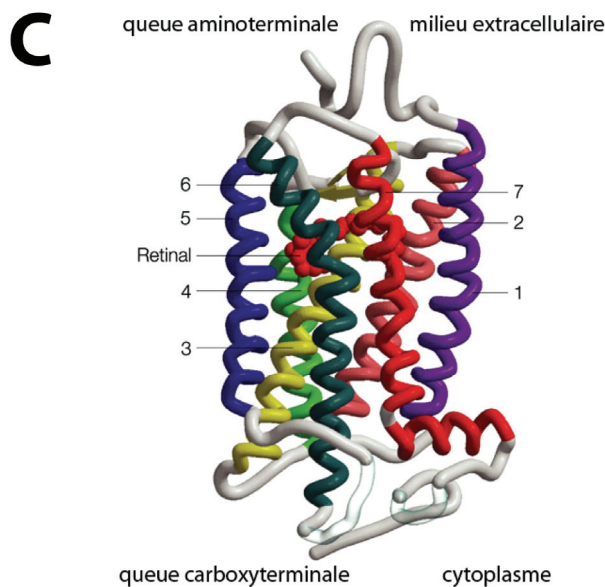


Figure 2 : Structure de la rhodopsine

A/ Structure primaire « en serpent » de la rhodopsine, montrant les sept domaines transmembranaires, la partie aminoterminal extracellulaire et la partie carboxyterminale intracellulaire. D'après Hargrave and McDowell, 1992.



B/ Profil d'hydrophobicité (Kyle & Doolittle) de la rhodopsine. On constate que les sept hélices transmembranaires sont détectables comme pics d'hydrophobicité le long de la protéine.



C/ Structure tridimensionnelle de la rhodopsine obtenue par cristallographie, montrant l'arrangement circulaire des hélices transmembranaires. On peut voir en rouge le rétinol, ligand cryptique (faisant partie de la protéine) présent au sein de la structure.

2.3 Activation et signalisation des RCPG

Comme on l'a vu, les RCPG possèdent un répertoire de ligand très étendu : amines biogéniques, neurotransmetteurs, lipides, peptides, protéines, odorants... (**Figure 3**). L'interaction du ligand avec la partie extracellulaire et les hélices transmembranaires induit l'activation du récepteur, c'est-à-dire le changement de son organisation tridimensionnelle (Meng and Bourne, 2001). Basé sur la structure de la rhodopsine et son activation sous l'effet de la lumière, il a été montré qu'au moment de l'activation, l'hélice 4 pivote d'environ 30° et se sépare de l'hélice 3 tandis que les hélices 6 et 7 s'écartent. Ceci ouvre un domaine plus large du côté cytoplasmique au sein de la structure, ce qui permet l'interaction avec une protéine G trimérique constituée de trois sous-unités α , β et γ (Marinissen and Gutkind, 2001) (**Figure 3**).

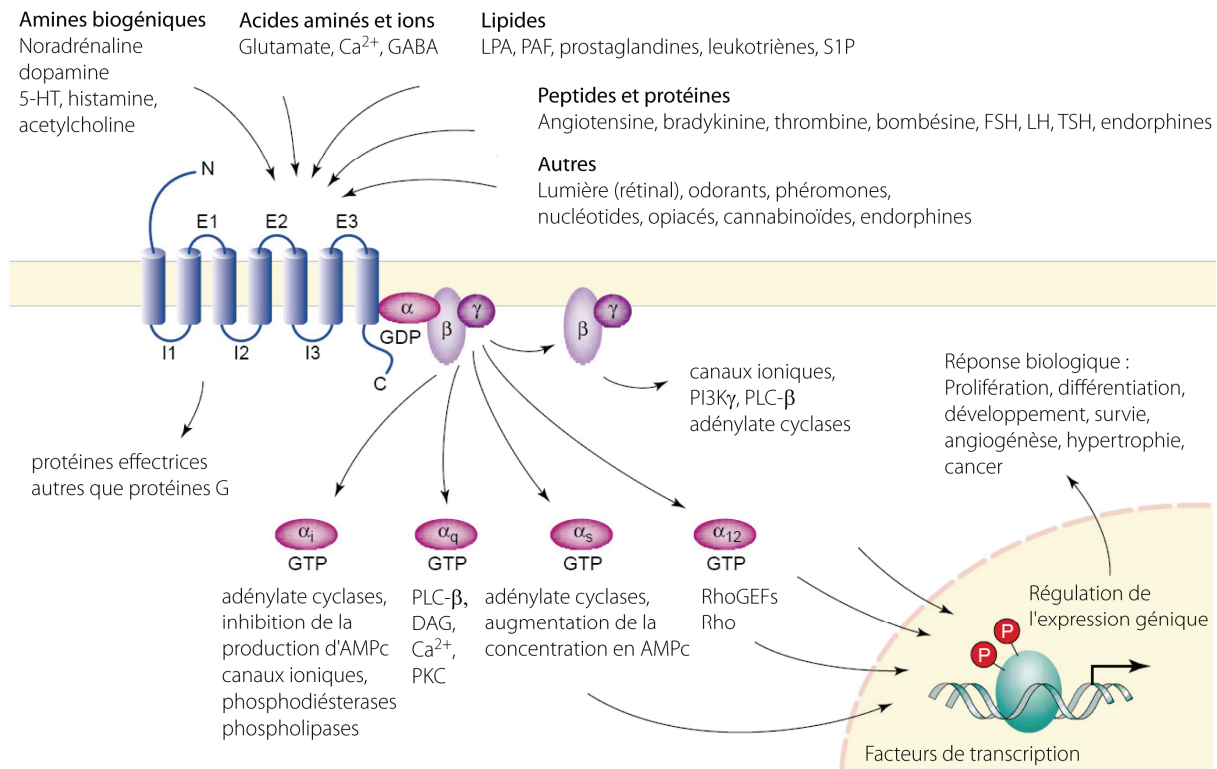


Figure 3 : Voies de signalisation des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

Les RCPG peuvent lier des ligands de nature très diverses (en haut). La fixation du ligand sur le récepteur provoque un changement de conformation qui permet au récepteur d'activer la protéine G trimérique (au centre). Celle-ci induit l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation par l'intermédiaire des sous-unités α et $\beta\gamma$. Les seconds messagers modulent notamment l'expression génique (en bas à droite), et l'ensemble des réponses permet la régulation spécifique des processus cellulaires en fonction de l'environnement extracellulaire. D'après Marinissen and Gutkind, 2001.

2.3.1 Cycle des protéines G

La protéine G est une GTPase, une protéine hydrolysant le guanosyl triphosphate (GTP) en guanosyl diphosphate (GDP) (Cabrera-Vera et al., 2003). Interagissant avec le récepteur activé, la protéine G s'active à son tour, libérant le GDP remplacé par du GTP au niveau de la sous-unité α (**Figure 4**). La sous-unité α active (liée au GTP) se détache des sous-unités $\beta\gamma$, et chacune de leur côté, les sous-unités α et $\beta\gamma$ initient des cascades de signalisation différentes suivant leur sous-type (pour les $G\alpha$: $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_s$ ou $G\alpha_{12}$, voir **Table 1**). Ces sous-unités modulent l'activité d'enzymes telles les adénylates cyclases (AC), les phospholipases C β (PLC β), les phospholipases A1, les tyrosines kinases, les phosphodiesterases (PDE), les phosphoinositide kinases (PI-Kinases), les GPCR kinases (GRK), les canaux ioniques, le circuit des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK)... Ceci induit des variations de la concentration de seconds messagers tels que l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le calcium intracellulaire ou le diacylglycérol (DAG). Cette activité des protéines G se poursuit jusqu'à ce que l'activité GTPase de la sous-unité α provoque l'hydrolyse du GTP en GDP, ramenant la protéine G à l'état de trimère $\alpha\beta\gamma$ inactif (**Figure 4**).

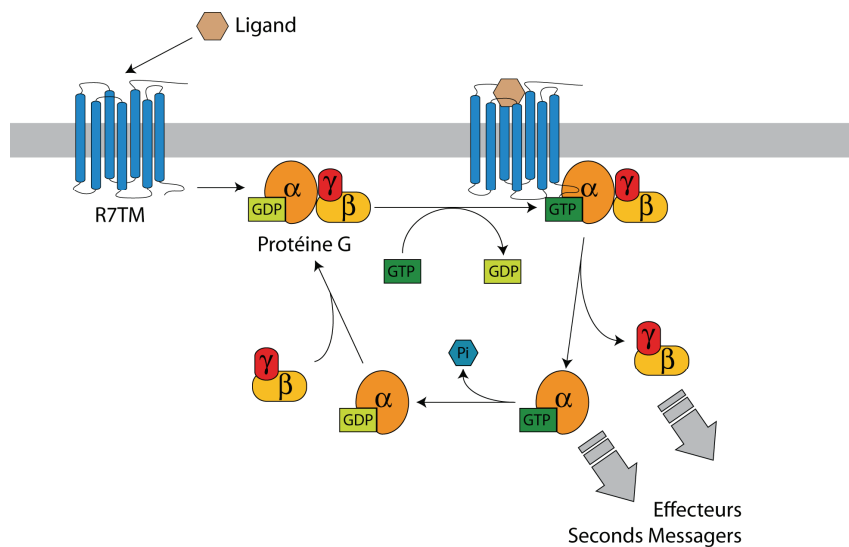


Figure 4 : Cycle des protéines G trimériques

Les protéines G sont des GTPases qui hydrolysent le GTP en GDP. A l'état inactif, la protéine est un trimère $\alpha\beta\gamma$ (en haut à gauche). Lorsqu'un récepteur est activé, il recrute le trimère et favorise l'échange du GDP par du GTP, ce qui active la protéine G (en haut à droite). Les sous-unités α et $\beta\gamma$ actives se séparent et provoquent la signalisation vers les effecteurs et seconds messagers (en bas à droite). L'activité GTPase de la sous-unité α provoque l'hydrolyse du GTP en GDP et inactive la sous-unité, qui capture alors les sous-unités $\beta\gamma$ pour reformer un trimère inactif (en bas à gauche). La propriété GTPase de la protéine G permet donc une activation limitée dans le temps, en réponse à l'activation d'un récepteur.

Table 1 : Sous-unités des protéines G trimériques

Type de sous-unité	Voie de signalisation
α_i	adénylate cyclase (AC) inhibition de la production d'AMPc canaux ioniques potassiques et calciques phosphodiesterase phospholipase
α_q	phospholipase C diacylglycérol (DAG) calcium protéine kinase C (PKC)
α_s	adénylate cyclase stimule la production d'AMPc canaux calciques
$\beta\gamma$	canaux ioniques phosphatidylinositol-3 kinase γ (PI3K γ) phospholipase C β (PLC- β) adénylate cyclase

2.3.2 Partenaires du cycle des protéines G

Le système RCPG \rightarrow protéine G \rightarrow second messenger permet une amplification efficace du signal et assure la diversité de la signalisation par l'intermédiaire de l'affinité sélective de chaque récepteur pour les différents sous-types de sous-unités α , β et γ (Table 1). De plus, le cycle d'activité des protéines G trimériques tel que décrit ci-dessus est régulé par d'autres protéines partenaires, qui sont appelées GAP (*GTPase Activating Protein*) lorsqu'elles accélèrent l'hydrolyse de GTP en GDP et inactivent la protéine G, ou GEF (*G-Protein Exchange Factor*) lorsqu'elles favorisent le remplacement du GDP par le GTP, activant la protéine G. Citons la famille des *Regulators of G-Protein Signaling* (RGS), qui régulent le cycle des protéines G (Wieland and Chen, 1999), mais possèdent également des rôles d'effecteurs et de molécules d'échafaudage dans le complexe RCPG-protéine G (Abramow-Newerly et al., 2005).

2.3.3 Protéines partenaires des GPCR autres que les protéines G

Au-delà de ce fonctionnement canonique de couplage aux protéines G, les RCPG interagissent avec d'autres protéines comme les arrestines, les GPCR kinases (GRK) et certaines

molécule d'échafaudage contenant des motifs protéiques PDZ ou SH2/SH3. Ces protéines jouent un rôle régulateur des R7TM, notamment pour leur trafic, leur regroupement dans des zones actives et leurs interactions avec le cytosquelette. Elles peuvent également induire une signalisation intracellulaire, par exemple la stimulation de la voies des MAPK kinases par les β -arrestines (Brady and Limbird, 2002; Hall and Lefkowitz, 2002). Un autre exemple d'interaction est la formation d'hétérodimères entre certains R7TM de la classe B et des protéines à un seul segment transmembranaire appelées *Receptor Activity Modifying Proteins* ou RAMP. Les protéines RAMP facilitent l'export membranaire des récepteurs et modifient leurs propriétés de liaison et de signalisation (Hay et al., 2006).

2.4 Pharmacologie des R7TM et activité constitutive

2.4.1 Modèle à deux états de l'activité d'un récepteur

Aux côtés de ces connaissances moléculaires et structurales, la pharmacologie construit des modèles décrivant les relations entre la liaison du ligand et l'activation des voies de signalisation par le récepteur. Dans le modèle le plus simple, le récepteur est considéré comme un interrupteur, à l'état inactif en absence de ligand et à l'état actif en présence du ligand activateur appelé agoniste. Un autre type de ligand, capable d'inhiber l'action de l'agoniste sans provoquer l'activation du récepteur, est appelé antagoniste. Si l'antagoniste se lie au récepteur sur le même site de liaison que l'agoniste, il est dit antagoniste compétitif. Les deux types de ligands, agoniste et antagoniste, sont aisément différenciés sur un graphe représentant l'intensité de la signalisation en fonction de la concentration du ligand (**Figure 5A**). Sur ce graphe, on peut mesurer l'affinité du ligand (c'est la concentration nécessaire à l'obtention de la moitié de l'effet maximal), ainsi que son efficacité e . Pour un agoniste, e est compris entre 0 et 1, c'est la mesure de l'effet relatif du ligand par rapport à l'effet d'un agoniste total de référence (d'efficacité égale à 1). Pour un agoniste partiel, l'efficacité est inférieure à 1, et pour un antagoniste n'induisant pas de signalisation, l'efficacité est nulle ($e=0$).

2.4.2 Activité constitutive et agonistes inverses

Au-delà de ce modèle simple d'interrupteur, il est apparu que certains récepteurs provoquaient une signalisation significative même en absence de ligand. Cette activité basale est appelée « activité constitutive » (Costa and Cotecchia, 2005). Le modèle le plus simple permettant de modéliser ce phénomène est le modèle à deux états (Leff, 1995), aussi appelé allostérique en référence au modèle allostérique de Monod, Wyman et Changeux de liaison de l'oxygène sur l'hémoglobine (Monod et al., 1965). Le modèle à deux états décrit le récepteur comme une

molécule possédant un équilibre chimique $R \leftrightarrow R^*$, entre une conformation inactive R et une conformation active R^* , qui est couplée aux voies de signalisation (**Figure 5B et 6A**). Si la population de récepteur en conformation active R^* est significative en absence de ligand, on observera une activité constitutive. Un agoniste, possédant une efficacité positive, déplace l'équilibre vers la conformation active R^* , provoquant une stimulation supplémentaire des voies de signalisation. Un composé qui n'a pas d'influence sur l'équilibre $R \leftrightarrow R^*$ (efficacité nulle), mais empêche la liaison de l'agoniste au récepteur, sera appelé antagoniste neutre. Dans ce modèle, un nouveau type de ligand peut être défini, qui possède une efficacité négative : ce ligand favorise la conformation inactive R, et inhibe ainsi l'activité constitutive du récepteur. Un tel ligand sera appelé « agoniste inverse » (de Ligt et al., 2000) (**Figure 5B**). On pourra remarquer qu'un agoniste inverse ne peut se distinguer d'un antagoniste neutre que si l'activité constitutive du récepteur est suffisante, permettant de détecter la diminution de la signalisation basale.

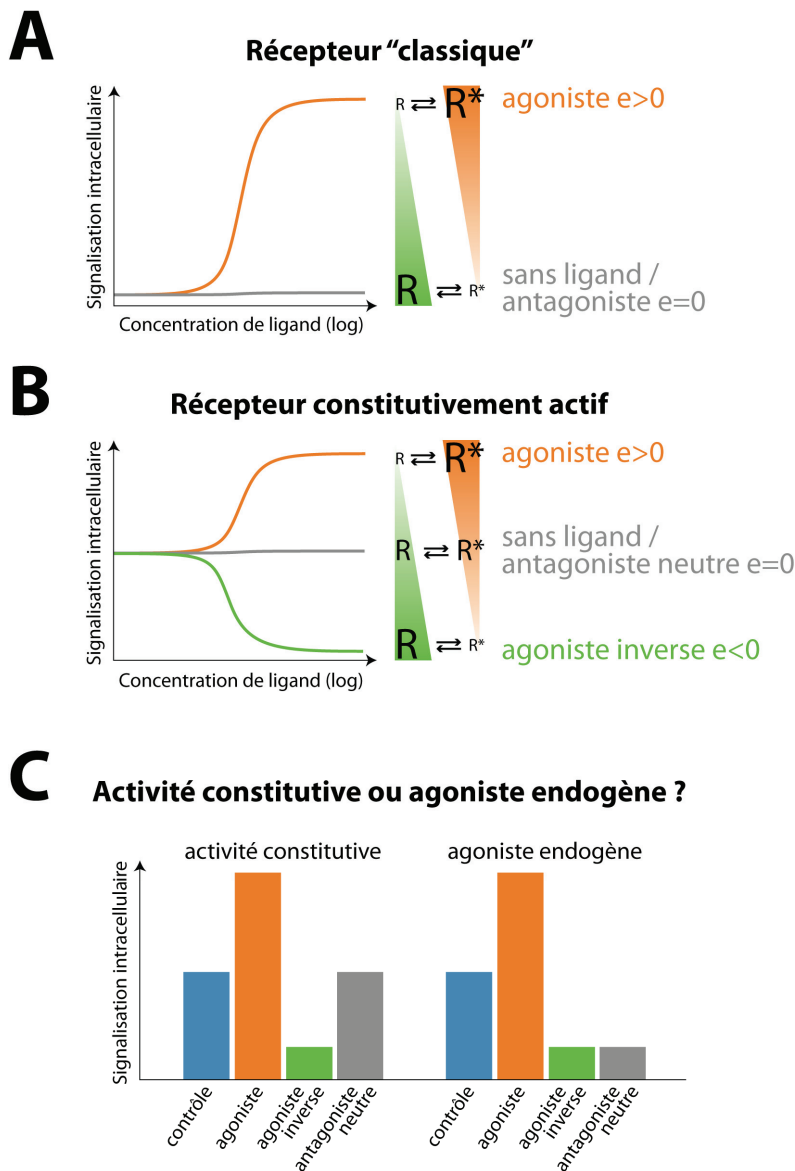


Figure 5 : Activité constitutive

A/ Un RCPG classique possède une réponse sigmoïde à la présence d'un ligand agoniste, permettant de définir son affinité (concentration amenant la moitié de l'effet) et son efficacité (valeur relative de l'effet maximal). L'agoniste favorise la présence de la conformation active R^* (orange). Un antagoniste a une efficacité nulle et laisse le récepteur en conformation inactive (gris).

B/ Si le récepteur possède une activité basale en absence de ligand, en plus de l'agoniste qui favorise la conformation active R^* ($e > 0$, orange) et de l'antagoniste neutre qui ne change pas l'équilibre $R \leftrightarrow R^*$ ($e = 0$, gris), on peut trouver des ligands qui favorisent la population inactive R et diminuent l'activité basale ($e < 0$, vert).

C/ Dans un système pharmacologique, la distinction entre activité antagoniste d'agonistes endogènes et agoniste inverse réel nécessite l'utilisation d'un antagoniste neutre (en gris), car les agonistes et agonistes inverses peuvent induire des variations similaires de la signalisation (bleu, vert et orange).

2.4.3 Extensions du modèle : ternaire et ternaire étendu

En plus de l'activité constitutive, les RCPG possèdent bien d'autres propriétés nécessitant un raffinement de leur description pharmacologique. Historiquement, le premier phénomène observé a été la présence de sites de liaison de haute et basse affinités pour les ligands agonistes. Pour expliquer ce phénomène, un modèle introduisant des états couplés [récepteur + protéine G] et [agoniste + récepteur + protéine G] a été développé : c'est le modèle ternaire. Dans les expériences de liaison du $^{35}\text{[S]GTP}\gamma\text{S}$, ce modèle permet d'expliquer la transformation des courbes d'affinité lorsque l'on ajoute du GTP en excès aux préparations de membranes (**Figure 6B**). La réunion du modèle ternaire et du modèle à deux états génère le modèle dit ternaire étendu, qui prend en compte à la fois les effets d'activation constitutive et de couplage aux protéines G (Samama et al., 1993) (**Figure 6C**). L'existence d'un précouplage des protéines G aux formes inactives du récepteur a nécessité l'extension du modèle ternaire étendu vers un modèle cubique (**Figure 6D**).

2.4.4 Modèles complexes : hypercubes et micro-états

Il est apparu que le paradigme R7TM \rightarrow protéine G unique \rightarrow signalisation n'est pas absolu, et que certains récepteurs peuvent activer des voies de signalisation différentes par l'intermédiaire de types de protéine G distinctes (Hur and Kim, 2002). De plus, ces couplages multiples peuvent être activés de manière différentielle par des ligands différents. Il a donc été nécessaire d'introduire le couplage à plusieurs types de protéines G ainsi que l'existence d'états activés distincts possédant chacun leur signalisation. L'extension des modèles d'équilibres a engendré des modèles de plus en plus compliqués, dit hypercubiques (Christopoulos and Kenakin, 2002), et toute une faune de ligands et de concepts (agonistes protéés, antagonistes permissifs, efficacité collatérale...) (Kenakin NRDD 2005). Pour aborder la multiplicité réelle des états actifs ou inactifs, en prenant en compte le microenvironnement et le type de ligand, le plus efficace est de généraliser les états discrets grâce au modèle des micro-états. Cette modélisation prend en compte la multitude des conformations possibles pour les états actifs ou inactifs et conceptualise cette multitude d'états comme autant de minima d'énergie rencontrés par le récepteur se déformant sous l'effet des interactions avec ses partenaires (Kenakin, 2004a) (**Figure 6E**). Cependant, ces modèles visant à la description précise des phénomènes observés comportent un nombre de variables indépendantes inatteignable par l'expérience : la possession de quelques ligands pour un récepteur donné ne permet de placer qu'un nombre limité de points sur ce « paysage énergétique » du récepteur étudié.

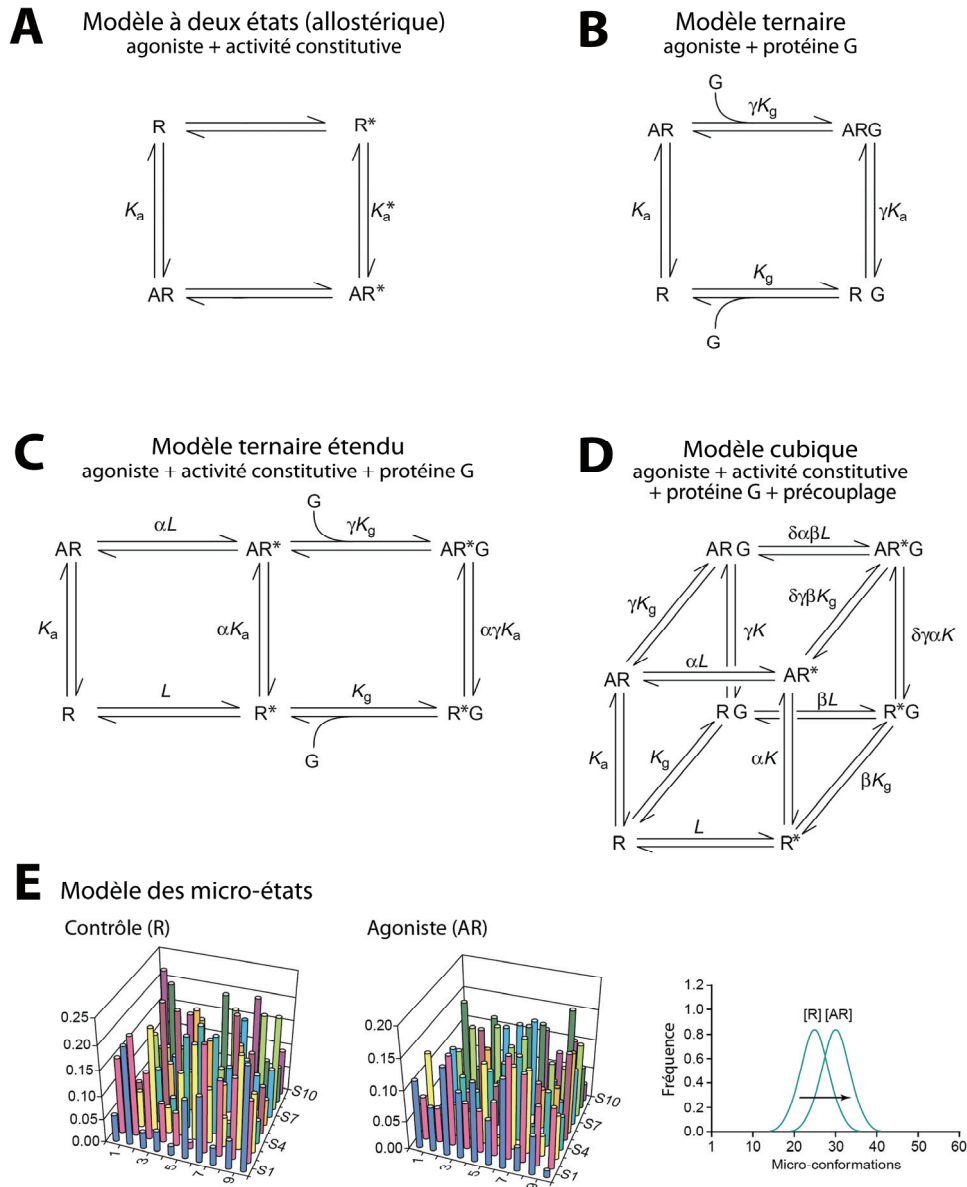


Figure 6 : Modélisation pharmacologique des RCPG

De nombreux modèles visent à établir les relations entre la présence du ligand et l'effet physiologique. Par ordre de complexité: le modèle à deux états ou allostérique (A), le modèle ternaire (B), le modèle ternaire étendu qui fusionne les deux modèles précédents (C) et le modèle cubique (D) (d'après Christopoulos and Kenakin, 2002). A la limite des modèles d'états discrets, le modèle des micro-états décrit les changements de conformation comme un changement de probabilité d'occupation d'une infinité de conformations énergétiques (E) (d'après Kenakin, 2004).

2.4.5 Détection et pertinence de l'activité constitutive des RCPG

Comme on l'a vu lors de la présentation du modèle à deux états $R \leftrightarrow R^*$, activité constitutive et agonisme inverse vont de pair, conceptuellement et expérimentalement. L'existence d'une activité constitutive est en général démontrée par l'activité agoniste inverse de certains ligands antagonistes. L'activité constitutive a néanmoins eu du mal dépasser son statut de curiosité théorique et à prendre la place qu'elle mérite parmi les mécanismes pharmacologiques. En effet, la vision classique des récepteurs est celle d'un interrupteur permettant de détecter la présence du ligand au dessus d'un certain seuil. Pour optimiser la sensibilité du système, il est important que le « bruit de fond » soit minimal, et donc que le récepteur soit absolument inactif en absence de ligand. C'est le cas de la rhodopsine, dont la signalisation est rigoureusement nulle en absence de lumière, ce qui permet quasiment à l'œil humain de détecter un unique photon ! Les récepteurs constitutivement actifs ont tout de même un avantage par rapport à ces interrupteurs ultrasensibles : leur capacité d'adaptation. Contrairement à des récepteurs ne fonctionnant qu'à partir d'un état inactif, la modulation de l'activité constitutive vers le haut ou vers le bas par les ligands ou par les protéines interagissant avec le récepteur constitutivement actif permet à celui-ci d'adapter sa signalisation en fonction des conditions, ce qui constitue un avantage indéniable dans le cadre d'une fonction biologique.

Une critique souvent formulée est l'aspect artefactuel de l'activité constitutive, qui serait la conséquence d'une surexpression grossière des récepteurs étudiés. De fait, l'activité constitutive et l'existence d'agonistes inverses a d'abord été mise en évidence dans des systèmes présentant des taux d'expression élevés de récepteurs, comme pour les récepteurs δ opioïdes dans les cellules NG108-15 (Costa and Herz, 1989) : l'augmentation de la densité de récepteurs est une manière de rendre l'activité constitutive détectable. Ainsi, l'activité constitutive d'un récepteur a souvent été décelée dans des systèmes d'expression hétérologues (Seifert and Wenzel-Seifert, 2002), et la surexpression des récepteurs β_2 adrénergiques a été le premier moyen de révéler l'effet de l'activité constitutive d'un R7TM *in vivo* (Bond et al., 1995). Cependant, l'activité constitutive des récepteurs histamine H3 naïfs a constitué la première démonstration d'activité constitutive naturelle *in vivo* (Morisset et al., 2000). Une démonstration rigoureuse de l'activité constitutive du récepteur H3 a été possible grâce à la possession d'un ligand agoniste inverse, mais également d'un antagoniste neutre du récepteur H3. Peu de RCPG possèdent un antagoniste d'efficacité rigoureusement nulle dans le répertoire de leurs ligands, mais seul cet antagoniste permet d'invalider l'hypothèse d'une activité constitutive apparente, résultant en réalité de la présence de ligands agonistes endogènes (ici l'histamine) présents *in vivo* (voir **Figure 5C**). Une activité constitutive *in vivo* a été démontrée

depuis pour les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{2a} et 5HT_{2c} (De Deurwaerdere et al., 2004; Berg et al., 2005), et joue également un rôle dans les systèmes régulant la prise de nourriture par le biais des récepteurs de la ghreline et de la mélanocortine (Adan and Kas, 2003). L'activité constitutive est donc une propriété physiologique pertinente de nombreux R7TM.

Au niveau thérapeutique, de nombreux médicaments considérés comme des antagonistes possèdent en réalité une activité agoniste inverse sur leur récepteur (Kenakin, 2004b) (**Table 2**). Ces médicaments agonistes inverses possèdent-ils des avantages thérapeutiques sur les substances antagonistes neutres ? Ce pourrait être le cas de pathologies caractérisées par l'apparition ou la surexpression de récepteurs constitutivement actifs. Des mutations provoquant l'apparition d'une forte activité constitutive sont le point de départ de pathologies comme l'hyperthyroïdisme ou la puberté précoce (**Table 3**, Parnot et al., 2002; Schoneberg et al., 2004; Kenakin, 2005). Dans le cas du sarcome de Kaposi, le virus associé à cette maladie induit l'expression d'un R7TM constitutivement actif facilitant l'infection (Vischer et al., 2005). L'activité constitutive de récepteurs peut avoir un effet transformant, et un rôle dans l'apparition de cancers (Allen et al., 1991). Dans certains cancers, notamment du pancréas, les tumeurs formées montrent une grande surexpression de RCPG dont l'activité basale pourrait avoir un rôle dans la progression tumorale (Virgolini et al., 1994).

Table 2 : Médicaments ayant une activité agoniste inverse sur un RCPG

Molécule	Médicament (France)	Action thérapeutique	Récepteur cible	Agoniste Inverse
olanzapine	Zyprexa	antipsychotique	5-HT _{2c} /5-HT _{2a}	Oui
losartan	Forzaar/Cozaar	cardiovasculaire	angiotensine AT1	Oui
risperidone	Risperdal	antipsychotique	5-HT ₂ , dopamine D2, D3	Oui
fexofenadine	Telfast	respiratoire	histamine H1	Probable
clopidogrel	Flavix	thrombose	P2Y12	Incertain
valsartan	Cotareg/Nisisco	hypertension	AT ₁	Incertain
montelukast	Singulair	respiratoire	cystényl leukotriène CysLT1	Incertain
loratidine	Clarityne	respiratoire	histamine H1	Probable
quetiapine	-	antipsychotique	dopamine D2, 5-HT _{2c} , 5-HT _{2a}	Incertain
cetirizine	Zyrtec	respiratoire	histamine H1	Probable
metoprolol	Lopressor/Selokene	cardiovasculaire	β ₂ AR	Oui
tolterodine	Detrusitol	génito-urinaire	muscarinique M3/M2	Incertain
famotidine	Pepdine	gastro-intestinal	histamine H2	Oui

Comme on le voit, l'activité constitutive est une propriété importante des récepteurs à la fois pour la compréhension de leur fonctionnement et pour leur exploitation thérapeutique. En revanche, le rôle physiologique de la présence d'une activité constitutive *in vivo* reste mystérieux. Les indices de l'importance de ce rôle existent, notamment la découverte d'agonistes inverse endogènes, qui montre que l'organisme peut exploiter la modulation de l'activité constitutive dans un but fonctionnel : l'*Agouti-Related Peptide* (AGRP) est agoniste inverse sur les récepteurs à la mélanocortine MC1 et MC4, et régule le système de la prise de poids (Milligan, 2003). Cependant, le phénomène pharmacologique d'activité constitutive n'a pas encore trouvé sa place au sein de la biologie cellulaire et de la physiologie, et aucune hypothèse générale n'a été avancée à propos du rôle biologique de l'activité constitutive.

Table 3 : Activité constitutive de RCPG mutants et pathologies associées

Pathologie	Récepteur impliqué
retinitis pigmentosa	Rhodopsine
hyperthyroïdisme	<i>Thyrotropine Receptor</i> (TSH)
fertilité male après hypophysectomie	<i>Follicle Stimulating Hormone Receptor</i> (FSH)
puberté masculine précoce familiale	<i>Luteinising Hormone Receptor</i> (LHR)
hypocalcémie autosomale dominante	<i>Calcium sensing receptor</i>
chondroplasie de Jansen	<i>Parathyroid Hormone/PH related Peptide receptor</i> (PTH/PTHrP)
sarcome de Kaposi	<i>Kaposi's Sarcoma associated HerpesVirus GPCR</i> (KSHV-GPCR)

2.5 Endocytose des RCPG après activation

Nous avons exposé comment un récepteur était susceptible d'activer des voies de signalisations intracellulaires en réponse à la présence d'un ligand, ou à cause d'une activation constitutive. Que deviennent les récepteurs après cette activation ? Il se produit un phénomène appelé désensibilisation, c'est-à-dire diminution de la réponse cellulaire lors d'une stimulation prolongée d'un récepteur par un agoniste (Kristiansen, 2004). Cette baisse de la réponse fait intervenir deux phénomènes étroitement intriqués : le découplage entre le récepteur et la protéine G, et le retrait des récepteurs activés de la membrane plasmique par endocytose. On peut décomposer les événements qui se déroulent lors de la stimulation prolongée d'un RCPG comme il suit (Ferguson, 2001):

- stimulation des voies de signalisation associées au récepteur ;

- désensibilisation à court terme médiée par la phosphorylation du RCPG par les GPCR Kinases (GRK), suivie de la liaison des β -arrestines qui découplent le récepteur et la protéine G au niveau de la membrane plasmique ;
- endocytose du complexe récepteur-ligand, suivie d'un parcours à travers différents compartiments intracellulaires, se terminant par le retour du récepteur à la membrane plasmique (recyclage), ou par la destruction du récepteur dans les lysosomes (dégradation).

Les étapes d'activation, de signalisation et de désensibilisation ont pu être visualisées et mesurées en temps réel au sein de cellules vivantes par des méthodes de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), méthodes permettant de mesurer le changement de conformation du récepteur par FRET intramoléculaire (Villardaga et al., 2003), ou bien l'interaction avec les protéines G, les GRK ou les β -arrestines par FRET intermoléculaire (Krasel et al., 2004). Ces études ont montré que l'interaction avec les protéines G se faisait dans la seconde suivant l'activation du récepteur, tandis que la désensibilisation se produit entre dix secondes et une minute après l'activation du récepteur. L'endocytose qui suit ces événements est un mécanisme cellulaire fondamental, qui sépare physiquement le récepteur du milieu extérieur : on peut visualiser l'endocytose comme un moyen pour la cellule de gérer la présence de récepteurs à la fois occupés par leurs ligands et découplés de la signalisation. Ces récepteurs constituent des protéines « inutiles » à la membrane plasmique que la cellule doit prendre en charge : les récepteurs sont internalisés, permettant soit le détachement du ligand et le recyclage du récepteur, soit la dégradation du complexe ligand-récepteur. Le phénomène d'endocytose possède en outre une importance supplémentaire pour les RCPG, car il influence le phénomène de désensibilisation : selon l'équilibre des différents processus (phosphorylation, découplage, internalisation, recyclage, dégradation), l'effet de l'endocytose peut diminuer ou augmenter la désensibilisation (Scott et al., 2004). Or, les effets de la désensibilisation sont importants car, dans un cadre thérapeutique, l'organisme est le plus souvent exposé de manière prolongée aux molécules thérapeutiques, surtout dans le domaine des substances psychoactives. A l'interface entre la biologie cellulaire et la pharmacologie, examinons à présent l'endocytose cellulaire, avant de détailler les mécanismes de l'endocytose des RCPG en particulier.

3 Endocytose et trafic intracellulaire

Dans ce travail de thèse, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponse à la question « Quel est le rôle biologique de l'activité constitutive d'un récepteur axonal comme CB1 ? » et nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'activité constitutive sur le trafic intracellulaire et la localisation subcellulaire du récepteur CB1. Il est donc intéressant de rappeler brièvement les principaux mécanismes permettant de retirer (endocytose/internalisation) ou d'apporter (export/recyclage) des protéines membranaires à la membrane plasmique, avant de récapituler plus spécifiquement l'endocytose et le trafic intracellulaire des RCPG.

3.1 Présentation : les différents types d'endocytose

Toutes les cellules sont capables d'endocytose et de recyclage. Ceci est indispensable à la création et au maintien de leur intégrité membranaire, et permet de réguler la présence de protéines ou de lipides à leur surface (Mukherjee et al., 1997). Il existe plusieurs types d'endocytose qui emportent les récepteurs vers un système de compartiments intracellulaires complexes. La connaissance des caractéristiques morphologiques et cinétiques de ces compartiments a d'abord été acquise grâce à l'étude de marqueurs en microscopie électronique : ligands, phases fluides ou récepteurs (Roth, 2005). Citons la transferrine et son récepteur le TfR (*Transferrine Receptor*) qui cycle continuellement par endocytose et recyclage et dont le parcours intracellulaire a contribué à la définition des compartiments endosomaux, ou encore les marqueurs de phase fluide inertes et non digestibles par la cellule comme les polymères de dextran. Le développement des techniques d'imagerie des cellules vivantes a permis de constater le caractère hautement dynamique de l'endocytose, du trafic intracellulaire et des organelles impliquées (Perrais and Merrifield, 2005), et un bel exemple dans le travail réalisé par Marino Zérial et ses collaborateurs (Rink et al., 2005).

Dans son acception la plus générale, l'endocytose est définie comme l'ensemble des mécanismes permettant à la cellule d'ingérer des éléments extérieurs (molécules, protéines, particules, autres cellules). Elle comprend trois phénomènes : la phagocytose (« cellule qui mange »), la pinocytose (« cellule qui boit ») et l'endocytose médiée par des récepteurs (**Figure 7**). La phagocytose permet l'ingestion de grosses particules et d'autres cellules. Bien qu'elle soit présente dans beaucoup de types cellulaires, elle est avant tout importante dans les cellules spécialisées comme les macrophages et possède un rôle dans la construction de l'immunité cellulaire. La pinocytose et la macropinocytose sont des moyens pour la cellule d'absorber des solutés du milieu environnant de manière aspécifique. L'endocytose médiée par des récepteurs

permet d'internaliser à la fois les molécules fixées sur leur récepteur spécifique et les protéines membranaires. Elle regroupe plusieurs mécanismes différenciés par le type d'invagination qui constitue leur point de départ : puits recouverts de clathrine, puits non recouverts de clathrine, et cavéoles (Mellman, 1996, **Figure 7**).

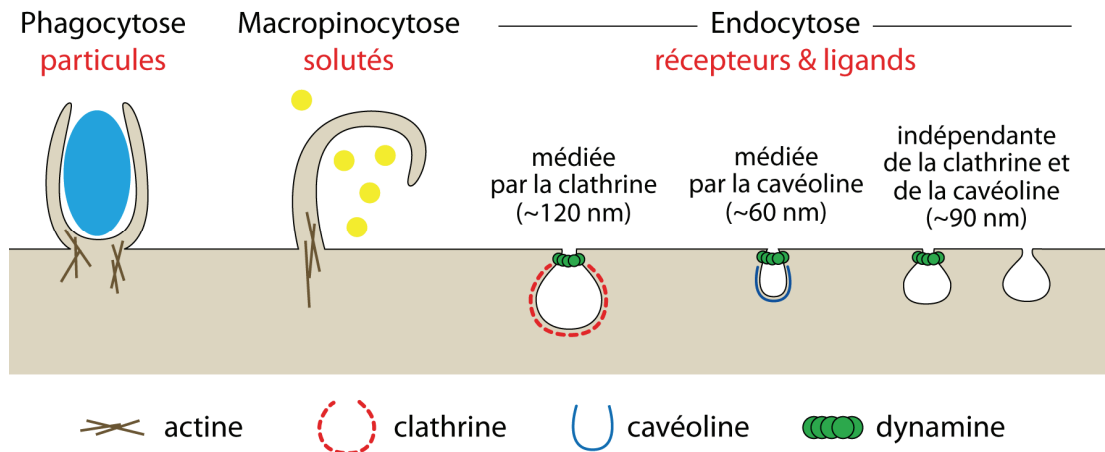


Figure 7 : Types d'endocytose cellulaire

Les cellules possèdent plusieurs moyens pour intégrer des particules ou des solutés. La phagocytose (à gauche en bleu) permet l'ingestion de grosses particules ($>1\mu\text{m}$), tandis que la pinocytose/macropinocytose permet d'englober un volume de liquide extracellulaire grâce à des extensions de la membrane (à gauche en jaune). L'endocytose médiée par des récepteurs permet l'entrée de ligands, de récepteurs et de protéines membranaires, et peut se faire grâce à des puits recouverts de clathrine (au centre, en rouge), des cavéoles (à droite, en bleu) ou des mécanismes indépendants de la clathrine et de la cavéoline (à droite). D'après Conner and Schmid, 2003.

3.1.1 Mécanismes de l'endocytose : rôle de la clathrine

Chez les vertébrés, le mécanisme d'endocytose dominant est l'endocytose dépendante de la clathrine. Celui-ci fait intervenir la liaison de la particule ingérée à un récepteur spécifique, puis le regroupement des récepteurs au sein de puits (structures incurvées d'environ 120 nm) recouverts d'un assemblage de clathrine. Ces puits deviennent des vésicules intracellulaires après avoir été détachés de la membrane plasmique. Historiquement, la clathrine a d'abord été mise en évidence dans la création de vésicules synaptiques. La présence de ces vésicules en très grand nombre dans les terminaisons nerveuses a permis l'isolement de nombreuses protéines partenaires au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique (Slepnev and De Camilli, 2000), et les homologues non neuronaux de ces protéines ont ensuite été caractérisés, démontrant le caractère général de ce mécanisme d'endocytose. Notamment, l'endocytose par voie dépendante de la clathrine est une voie majeure d'internalisation des RCPG (Scott et al., 2004).

D'autres voies d'endocytose indépendantes de la clathrine existent. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique (d'une taille comprise entre 50 et 60 nm), recouvertes

d'une protéine appelée cavéoline et qui peuvent se détacher de surface en particulier lors de l'endocytose de la toxine cholérique ou du virus SV40 (Pelkmans and Helenius, 2002; Hommelgaard et al., 2005). Ces résultats sont cependant discutés et les cavéoles semblent être des structures stables à la membrane, capables d'endocytose seulement sous certaines conditions d'activation et de stimulation (Thomsen et al., 2002). Des voies d'endocytose indépendantes à la fois de la clathrine et des cavéoles ont également été postulées, mais n'ont pas été caractérisées précisément à ce jour (Sandvig and van Deurs, 1994).

3.1.2 Les compartiments endosomaux : anatomie

Après l'endocytose, les vésicules sont libérées de leur manteau de clathrine et entrent dans les compartiments endosomaux (**Figure 10**). Elles fusionnent tout d'abord avec les endosomes précoces. Dans ces endosomes, le pH acide (pH~5,0) détache le ligand du récepteur. À partir des endosomes de tri, les éléments transportés, parfois appelés cargaison (*cargo*) sont envoyés vers deux circuits distincts :

- le circuit de recyclage qui passe par les endosomes de recyclage, compartiments périnucléaires d'où les récepteurs des cargos peuvent être renvoyés vers la membrane plasmique,
- le circuit de dégradation qui se dirige d'abord vers les endosomes tardifs et les corps multivésiculaires, puis vers les lysosomes où les ligands et les protéines membranaires sont dégradées par un pH de plus en plus bas et par l'action d'enzymes de dégradation spécialisées (Maxfield and McGraw, 2004).

Il existe également une voie de recyclage, dite rapide, permettant le retour à la membrane plasmique depuis les endosomes de tri. Un modèle astucieux explique le tri entre récepteurs recyclés et ligands dégradés par la topologie des endosomes de tri, qui poussent de longs tubules à partir d'un corps central vésiculaire. Les vésicules d'endocytose fusionnent avec les tubules, et le pH acide détache le ligand du récepteur. Le ligand se concentre dans la partie centrale sphérique où le rapport surface/volume est faible, et d'où partent les vésicules en direction des endosomes tardifs et des lysosomes, tandis que les récepteurs sont plus concentrés le long des tubules, là où le rapport surface/volume est grand, et les vésicules dirigées vers les endosomes de recyclage se forment à cet endroit (Mellman, 1996).

Il est cependant clair que les récepteurs et les protéines membranaires connaissent des destins variables et ne sont pas systématiquement recyclés à la membrane, ce qui implique l'existence de mécanismes de tri sélectifs. Historiquement, deux récepteurs modèles, qui ne sont pas des RCPG, ont été étudiés et ont permis de définir les voies de trafic intracellulaires après

endocytose. Le récepteur à la transferrine TfR cycle constitutivement entre la membrane et les compartiments endosomaux, empruntant les voies d'endocytose et les voies de recyclage rapides et lentes. Le récepteur modèle pour les récepteurs dirigés vers les voies de dégradation est EGFR, le récepteur tyrosine kinase du facteur de croissance épidermique ou *Epidermal Growth Factor* (EGF). Ce récepteur est très peu recyclé et majoritairement dirigé vers les endosomes tardifs et les lysosomes (Willingham et al., 1984).

Le système endosomal communique également avec les voies de synthèse, d'export et de maturation : il existe notamment des voies de communication entre les endosomes tardifs et le Golgi permettant l'apport des protéines structurelles de ces compartiments, ainsi que des voies entre le réseau trans-golgien (*Trans Golgi Network* TGN) et les endosomes de recyclage. Il faut garder à l'esprit que l'ensemble de ces voies de trafic ne sont pas efficaces à 100 %, et que certains marqueurs peuvent être distribués dans tous les compartiments. En outre, les différents compartiments endosomaux présentent une grande variabilité morphologique et sont hautement dynamiques, avec des échanges membranaires importants et continuels, ce qui rend parfois subtile leur identification. En définitive, le système endosomal peut et doit être imaginé comme un ensemble de structures dynamiques et interconnectées, présentant une mosaïque de domaines spécialisés (Gruenberg, 2001).

3.1.3 Biologie moléculaire de l'endocytose

L'endocytose par voie dépendante de la clathrine débute par le regroupement des récepteurs et de leur cargaison à la membrane, et la formation d'une structure complexe, le puits recouvert de clathrine (*Clathrin Coated Pit* CCP) (Conner and Schmid, 2003; Mousavi et al., 2004). Il est intéressant de détailler les constituants de cette structure et son mécanisme de formation, car la connaissance des protéines partenaires de ce processus permet d'agir sur l'endocytose, par le biais de mutants de ces protéines. Les composants les plus abondants des CCP sont la clathrine elle-même et l'adaptateur AP-2 (*Assembly Protein 2*) (**Figure 8A**). La clathrine est une protéine composée de trois sous-unités légères et de trois sous-unités lourdes s'assemblant en une structure en forme de trépied ou de triskèle. Ces structures peuvent s'assembler pour former des édifices hexagonaux plans, ou des édifices incurvés par assemblage d'hexagones et de pentagones. L'adaptateur AP-2 est constitué de quatre sous-unités α , β_2 , μ_2 et δ_2 arrangées en forme de « tête » possédant deux « oreilles ». AP-2 se place entre la membrane plasmique et le réseau de clathrine, la sous-unité β_2 interagissant avec la clathrine, et la sous-unité α avec la membrane plasmique, probablement grâce à la reconnaissance de certains lipides phosphoinositides, comme par exemple le PtdIns(4,5)P₂ ou phosphatidylinositol(4,5)diphosphate. Des protéines membranaires partenaires

comme AP180 et l'epsine interagissent aussi avec les phosphoinositides et AP-2. Eps15 (*EGF receptor pathway clone #15*) est une protéine qui interagit avec l'epsine et AP180, permettant le recrutement de la protéine AP-2 autour des zones d'assemblage de la clathrine (**Figure 8B**).

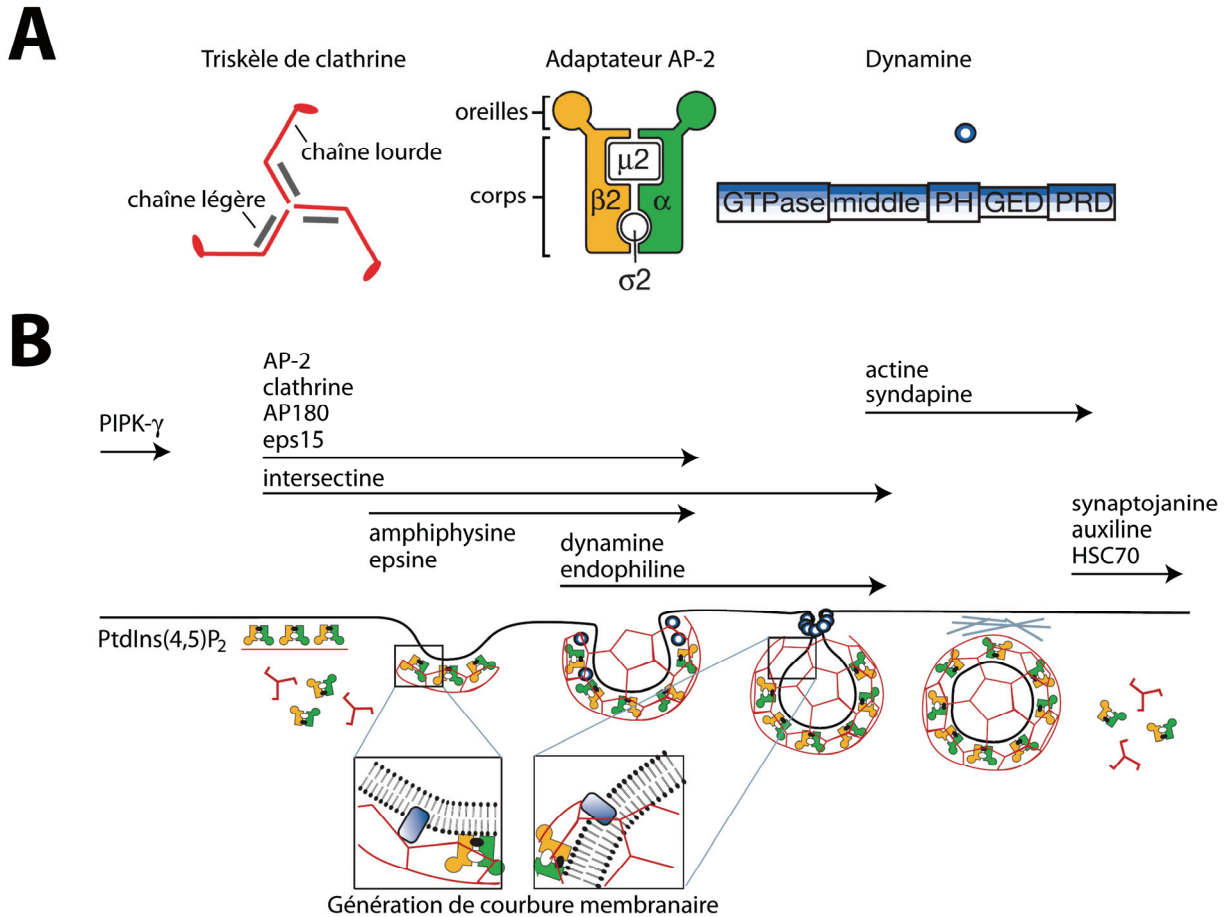


Figure 8 : Mécanismes de l'endocytose médiée par la clathrine

A/ Protéines impliquées dans l'endocytose par voie dépendante de la clathrine. La clathrine est un triskèle composé de deux fois trois sous-unités, qui interagit avec l'adaptateur AP-2 constitué de quatre sous-unités. La dynamine est une GTPase qui possède différents domaines d'interaction protéine-protéine et qui permet le détachement de la vésicule.

B/ Chronologie de l'implication de ces protéines ainsi que d'autres partenaires lors de la formation d'un puits recouvert de clathrine, puis d'une vésicule d'endocytose. D'après Conner and Schmid, 2003.

Les relations de causalité entre l'assemblage du puits recouvert de clathrine et la courbure de la membrane ne sont pas clairement établies, mais il est clair que l'invagination de la membrane nécessite un réarrangement lipidique au sein de la bicouche. Ce réarrangement fait intervenir le segment transmembranaire de l'epsine, et d'autres partenaires comme l'endophiline et la synaptojanine interviennent également (**Figure 8B**). Le cholestérol joue un rôle dans cette étape, soit en facilitant les interactions entre la membrane et AP-2, soit en permettant la déstabilisation

locale de la membrane nécessaire à l'invagination (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999). Cette invagination se poursuit après l'assemblage du réseau de clathrine grâce à l'action de l'endophiline.

La dernière étape de l'endocytose est la fission de la membrane qui transforme le puits en une vésicule intracellulaire. C'est la dynamine, une GTPase, qui réalise cette opération (**Figure 8A**). La dynamine interagit avec le manteau de clathrine par l'intermédiaire d'une protéine appelée amphiphysine, puis s'assemble autour de l'ouverture du puits en une hélice qui écarte le puits de la membrane plasmique. Ceci a été démontré en partie grâce au mutant *Shibire* de drosophile, qui possède une dynamine mutante incapable de terminer la fission. Cette mutation provoque la formation de puits recouverts de clathrine connectés à la membrane par un très long coup entouré de dynamine (De Camilli et al., 1995). La dynamine provoque la fission soit de manière mécanique en écartant la vésicule, soit en recrutant l'endophiline qui en modifie les lipides au niveau du cou de la vésicule et déclenche la fission. De plus, la dynamine est impliquée dans les premières étapes du transport de la vésicule car elle interagit avec des protéines régulant le cytosquelette comme *Abp1* (*Auxin binding protein 1*) et la cortactine. Une fois la vésicule détachée de la membrane, le manteau de clathrine se dissocie rapidement et la vésicule est dirigée vers les endosomes de tri.

3.1.4 Déterminants moléculaires du système endosomal

Une fois la vésicule d'endocytose formée, elle fusionne avec les structures endosomales. Les cargaisons et leurs récepteurs sont transportés au sein de ce système par le biais de fission et de fusions vésiculaires successives. Une machinerie complexe assure le maintien de l'identité moléculaire et fonctionnelle des différents compartiments, ainsi que la réalisation des événements de transport vésiculaire ciblé entre les compartiments. L'identité des compartiments et le transfert ciblé entre ceux-ci fait intervenir d'une part des GTPases comme la famille Rab ou Arf, d'autre part des lipides spécifiques comme les phosphoinositides (Behnia and Munro, 2005). On ne développera pas ici les mécanismes moléculaires permettant la fusion physique des bicouches lipidiques, qui font intervenir des complexes de protéines transmembranaires appelées SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptors*) (Bonifacino and Glick, 2004).

Les GTPases Rab (*Ras-related GTP binding protein*) et Arf (*ADP-rybosilation factor*), membres de la superfamille des protéines Ras, sont des interrupteurs moléculaires pouvant exister à l'état actif lié au GTP, ou à l'état inactif lié au GDP. L'état inactif est soluble et cytosolique, tandis que l'état actif est lié aux membranes. Ceci permet aux protéines Rab de s'associer à la membrane de certains compartiments de manière spécifique et d'y recruter d'autres protéines membranaires. Comme la liaison entre les GTPases et les membranes dépend de l'activité GTPase, les vésicules peuvent échanger rapidement les GTPases qui leur sont associées et ainsi traverser différents

compartiments identifiés (Rink et al., 2005). Il existe une soixantaine de Rab chez les mammifères, et beaucoup ont un rôle dans le transport intracellulaire, en association avec des organelles spécifiques. L'ancrage à la membrane se fait grâce à des résidus prénylés situés au niveau de la queue carboxyterminale (Figure 9A). Lorsqu'elles sont inactives, les protéines Rab sont liées au GDP et forment un complexe cytosolique avec une protéine appelée *GDP-Dissociation Inhibitor* (GDI). Le GDI masque les groupes prénylés et empêche l'association aux membranes. D'autres protéines appelées *GDI Displacement Factors* (GDF) catalysent la dissociation du complexe Rab-GDI, permettant l'insertion des groupes prénylés dans la membrane (Pfeffer and Aivazian, 2004). Une fois ancrée dans la membrane, la protéine Rab est activée par remplacement du GDP en GTP, favorisé par un *Guanine nucléotide Exchange Factor* (GEF). La protéine Rab ainsi activée peut interagir avec ses effecteurs. L'activité GTPase intrinsèque des protéines Rab est en général très faible, et l'intervention d'une *GTPase Activating Protein* (GAP) qui stimule l'hydrolyse du GTP est nécessaire. La protéine Rab redevenue inactive est alors retirée de la membrane par les GDI libres du cytosol. Des protéines Rab différentes sont présentes à la surface des différentes organelles, participant à la définition de leur identité moléculaire et fonctionnelle (Zerial and McBride, 2001). Le mécanisme gouvernant la spécificité de la présence des Rabs actives sur certaines organelles est peu connu, mais il est probable qu'il fait intervenir le ciblage dû aux différences entre les Rab elles-mêmes au niveau des domaines hypervariables (Chavrier et al., 1991) ainsi que la distribution différentielle des différents GDF et GEF (Pfeffer, 2005). Dans le système endosomal, les Rabs les mieux caractérisées sont Rab5, Rab4, Rab11, Rab7 et Rab9 (Figure 10).

Rab5 est présente sur les endosomes précoces et peut recruter de nombreuses protéines accessoires comme le facteur de fusion endosomal EEA1 (*Early Endosomal Antigen 1*) (Simonsen et al., 1998). Rab5 est associée aux vésicules endocytiques dès leur détachement de la membrane plasmique, et est également présente au niveau des endosomes de tri (Bucci et al., 1992). Deux protéines Rab sont impliquées dans les voies de recyclage à partir des endosomes de tri et des endosomes de recyclage : Rab4 intervient dans les voies de recyclage rapide à partir des endosomes de tri et des endosomes de recyclage (van der Sluijs et al., 1992), tandis que Rab11 est préférentiellement associée aux voies recyclage lent depuis les endosomes de recyclage (Ullrich et al., 1996; Sonnichsen et al., 2000). Deux autres GTPases, Rab7 et Rab9, sont associées aux voies de maturation/dégradation et présentes à la surface des endosomes tardifs (Lombardi et al., 1993; Feng et al., 1995).

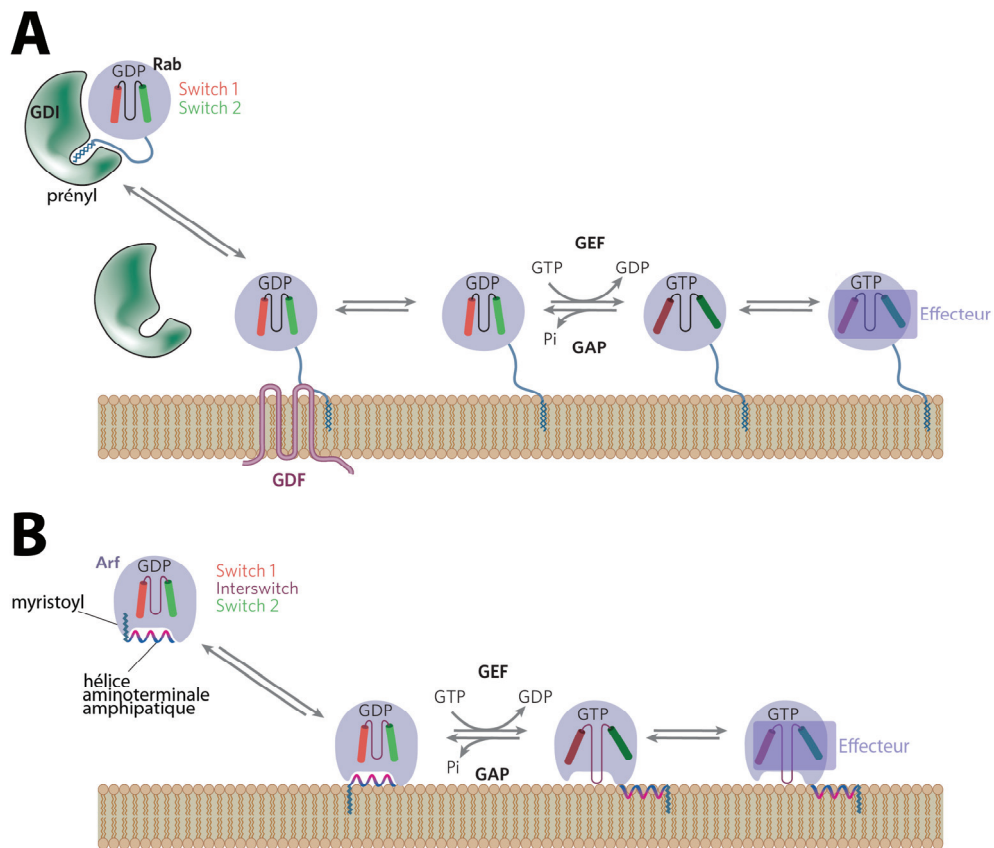


Figure 9 : Mécanismes de l'action des GTPases Rab et Arf

A/ Les protéines Rab possèdent un résidu prénylé qui est masqué à l'état inactif (lié au GDP) par un *GDP Dissociation Inhibitor* (GDI). Sous l'action d'un *GDI Displacement Factor* (GDF), la Rab est libérée du GDI et s'accroche aux membranes (à gauche). Le *Guanine nucléotide Exchange Factor* (GEF) peut dès lors favoriser le remplacement du GDP par du GTP, activant la Rab qui interagit avec ses effecteurs (à droite). Le GTP est finalement hydrolysé avec l'aide d'une *GTPase Activating Protein* (GAP), ce qui inactive la Rab qui est ensuite retirée de la membrane par le GDI cytosolique (de droite à gauche).

B/ Les protéines Arf ont un mécanisme d'action similaire, mais le domaine d'accrochage membranaire est myristoylé. L'ancrage dans la membrane est favorisé par l'activation de la protéine, c'est-à-dire le chargement du GTP.

D'après Behnia and Munro, 2005.

En ce qui concerne les GTPases Arf, la protéine Arf6 est présente à la membrane plasmique et possède un rôle dans l'endocytose. Les protéines Arf possèdent un groupe myristoylé qui est caché au sein de la protéine inactive (liée au GDP). Lorsque la protéine est activée par un GEF qui échange le GDP par du GTP, le changement de conformation expulse les résidus myristoylés de la structure et Arf s'ancre à la membrane, puis interagit avec ses effecteurs (**Figure 9B**). Comme pour les Rab, l'action d'un GAP est nécessaire pour l'hydrolyse du GTP et le retour de la protéine Arf à sa forme inactive cytosolique. À la membrane plasmique, Arf6 permet le recrutement des enzymes synthétisant le PtdIns(4,5)P₂, dont le rôle dans la formation des puits recouverts de clathrine a été évoqué plus haut (Krauss et al., 2003). De manière générale, les lipides phosphoinositides jouent un

rôle important dans l'établissement de l'identité des organelles (De Matteis and Godi, 2004) (**Figure 10**). Au niveau du système endosomal, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ permet le recrutement des puits recouverts de clathrine à la membrane plasmique et constitue également le point de départ de la synthèse de seconds messagers lipidiques comme le DAG et l'inositol triphosphate $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3$. Un autre phosphatidylinositol, $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ (ou PIP_3), est synthétisé par la PI3-Kinase (phosphatidylinositol-3-kinase), et enrichi au niveau des endosomes de tri, interagissant avec de nombreuses protéines qui possèdent un motif protéique FYVE ou PX.

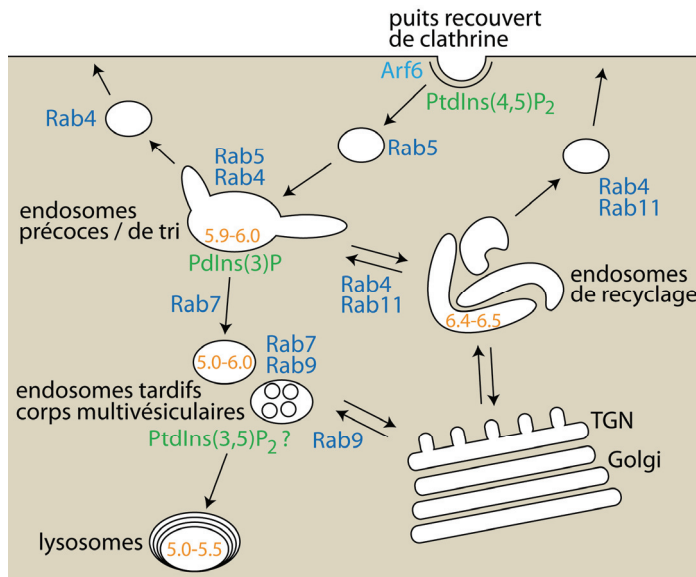


Figure 10 : Anatomie des compartiments endosomaux

Les compartiments endosomaux (en noir) possèdent une morphologie et un pH interne distincts (en orange). Les dernières étapes des voies de sécrétion (*Trans Golgi Network* TGN et Golgi) sont également représentées. Des GTPases Rab (en bleu foncé), ainsi que des GTPases Arf (en bleu clair) sont associées avec les différentes voies de transports et compartiments. En vert, sont signalés les lipides spécifiques à certains compartiments.

3.2 Régulation et trafic intracellulaire des RCPG

3.2.1 Présentation de l'endocytose des RCPG

Les RCPG, en tant que protéines membranaires, sont régulés par les processus d'endocytose. Dans ce cas, l'endocytose possède un rôle primordial, car elle permet d'une part de réguler la présence des récepteurs à la membrane, et donc la sensibilité de la cellule aux ligands, et d'autre part de récupérer les récepteurs après activation et désensibilisation par les *GPCR kinases* (GRK) et les β -arrestines. Dans le domaine de la neurobiologie, la régulation des RCPG par endocytose est l'une des bases de la plasticité neuronale, permettant l'établissement et la modulation des connexions nécessaires au fonctionnement cognitif. Le lien entre mécanismes moléculaires de régulation des RCPG (GRK et β -arrestines) et le fonctionnement cérébral a été étudié notamment grâce à l'évaluation comportementale des souris *knockout* pour les GRK ou les β -arrestines (Gainetdinov et al., 2004).

3.2.2 Désensibilisation à court terme

On parlera dans cette partie des événements amenant l'endocytose du récepteur après son activation, en gardant à l'esprit que la plupart des connaissances ont été obtenues par l'étude du récepteur β_2 adrénergique (β_2 AR) comme modèle. Le trafic intracellulaire, le tri et le recyclage seront abordés dans la partie suivante. On étudie ici les événements de désensibilisation à court terme (quelques minutes à quelques heures), faisant intervenir des translocations de RCPG entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires. En revanche, la désensibilisation à long terme (plusieurs jours) fait intervenir une variation du nombre total de récepteurs par le biais d'une dégradation facilitée ou d'une inhibition de la synthèse du récepteur (régulation transcriptionnelle) (Gagnon et al., 1998) ; cet aspect de la désensibilisation ne sera pas abordé ici.

3.2.3 Désensibilisation hétérologue et homologue

Les études de récepteurs chimères, c'est-à-dire de protéines fusion de fragments récepteurs différents, ont montré que les domaines déterminants pour la désensibilisation, l'endocytose et le recyclage des RCPG étaient situés dans la troisième boucle intracellulaire et dans la queue carboxyterminale de récepteurs. Ces domaines contiennent des groupes de résidus sérine et thréonine, qui peuvent être substrats de phosphorylations. Ces phosphorylations sont la cause première de la désensibilisation et on parlera, selon le type de kinase impliquée, de désensibilisation hétérologue ou homologue (Hausdorff et al., 1989):

- la désensibilisation hétérologue est un événement qui dépend de l'activité de kinases activées par les second messagers (PKA, PKC) et ne nécessite pas l'activation du récepteur qui en est la cible. Par exemple, le récepteur β_2 AR est phosphorylé par la PKA dans la troisième boucle intracellulaire (Ser262) et dans la partie proximale de la queue carboxyterminale (Ser346). Ces sites sont contenus dans les domaines d'interactions entre le RCPG et la protéine G : ces modifications influent donc fortement sur le couplage du récepteur et peuvent amener une diminution de la signalisation.
- la désensibilisation homologue est médiée par les GRK et les β -arrestines, et a spécifiquement pour cible des récepteurs activés. Les GRK reconnaissent la forme activée du récepteur et phosphorylent certains résidus de la queue carboxyterminale et des boucles intracellulaires. Les phosphorylations sont reconnues par les β -arrestines qui provoquent le découplage de la protéine G et l'arrêt de la signalisation.

3.2.4 Les G-protein coupled Receptor Kinases (GRK)

Il existe sept types de GRK chez l'homme : GRK1 (rhodopsine kinase) et GRK7 sont des GRK visuelles impliquées dans la régulation de la rhodopsine, tandis que les autres GRK, surtout GRK2 (aussi appelée β ARK1) et GRK6, sont ubiquitaires. Certaines GRK sont transportées entre la membrane et le cytoplasme en fonction de leur activité grâce à des interactions avec la membrane, avec les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G ou directement avec le récepteur (Penela et al., 2003). Les GRK peuvent sélectivement phosphoryler les formes actives du RCPG cible (Bouvier et al., 1988). Les phosphorylations se font dans la queue carboxyterminale dans le cas de la rhodopsine et du récepteur β_2 AR, mais certains récepteurs comme les récepteurs muscariniques M1 et M3 sont phosphorylés dans la troisième boucle intracellulaire (Ferguson, 2001). Un autre rôle des GRK serait le recrutement de PI3-Kinases au voisinage des récepteurs activés, permettant de générer un environnement lipidique propice à l'endocytose (Naga Prasad et al., 2002).

3.2.5 Autres protéines impliquées dans la phosphorylation des RCPG

Durant cette étape de phosphorylation, il a été montré que certaines protéines interagissent avec le récepteur β_2 AR afin de le placer au cœur d'un complexe multiprotéique comprenant GRK2, PKA et PKC. Le récepteur est donc le centre d'un réseau d'activité de phosphorylation dépendant de son état d'activation. Ces protéines sont appelées *A-Kinase Anchoring Proteins* (AKAP), comme AKAP79 et AKAP250 (ou gravine) (Wang et al., 2006).

3.2.6 Les arrestines ou β -arrestines

Les arrestines ont été caractérisées comme cofacteurs nécessaires pour la désensibilisation de la rhodopsine et du récepteur β_2 AR (Lohse et al., 1990). Il existe quatre types d'arrestines : deux arrestines (arrestines 1 et 4) interviennent dans la désensibilisation des récepteurs visuels, tandis que les arrestines 2 et 3 (ou β -arrestines 1 et 2) sont ubiquitaires et interviennent dans la désensibilisation de nombreux RCPG (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Elles ont un double rôle dans la désensibilisation des RCPGs, permettant d'une part le découplage des protéines G : elles se lient au récepteur phosphorylé et découplent par effet stérique le récepteur et la sous-unité α . D'autre part, les β -arrestines sont importantes pour les premières étapes de l'endocytose du récepteur car elles déclenchent le regroupement des récepteurs à la membrane plasmique (appelé *patching*) et le recrutement de la machinerie nécessaire à la formation d'un puits recouvert de clathrine. En effet, les arrestines interagissent avec la clathrine et l'adaptateur AP-2. Le rôle des arrestines est cependant plus large que ces deux rôles dans la désensibilisation, car elles sont le point de départ

d'un complexe de signalisation comportant une cinétique plus lente que la signalisation par le biais de protéines G (Luttrell and Lefkowitz, 2002). Notamment, les arrestines peuvent initier l'activation des voies MAP Kinases (Morrison and Davis, 2003), la transactivation des récepteurs tyrosine kinases tels l'EGF ou le PDGF (Pyne et al., 2003) et l'activation de tyrosines kinases telles que Src (DeFea et al., 2000).

3.2.7 L'endocytose des RCPG

Beaucoup de RCPGs sont internalisés après activation et désensibilisation en suivant une voie canonique caractérisée pour le récepteur modèle β_2 AR (Koenig and Edwardson, 1997). La liaison des β -arrestines permet le recrutement de l'adaptateur AP-2 en interagissant avec la sous-unité β de l'adaptateur, aidé par l'action de la PI3-Kinase (Naga Prasad et al., 2002). Le complexe [β -arrestine/AP-2] permet alors de recruter des monomères de clathrine qui s'assemblent en oligomères pour former un puits recouvert de clathrine (Laporte et al., 1999). Il semble cependant que les récepteurs activés ne créent pas *ex nihilo* un nouveau puits recouvert de clathrine mais se rassemblent au-dessus de structures d'oligomères de clathrine préétablies, susceptibles de réaliser l'internalisation des récepteurs (Santini et al., 2002; Scott et al., 2002). Le puits devient vésicule qui est détachée de la membrane sous l'action de la dynamine et entre dans les voies de trafic endocytiques.

De nombreux RCPG sont internalisés par cette voie GRK/arrestine/clathrine, et les études de l'implication de protéines partenaires (eps15, dynamine) montrent que ce mécanisme général est valable pour les nombreux RCPGs endocytés par la voie dépendante de la clathrine. Une endocytose indépendante de la clathrine et de la dynamine a été postulée pour certains RCPGs, notamment le récepteur AT_{1A} (Zhang et al., 1999) ou dopamine D2 (Vickery and von Zastrow, 1999). Cependant, beaucoup de ces résultats sont basés sur des inhibiteurs « spécifiques » des voies dépendantes de la clathrine qui en réalité possèdent de nombreux effets aspécifiques. De plus, il semble possible que l'inhibition de l'endocytose par voie dépendante de la clathrine soit susceptible d'induire l'endocytose par d'autres voies compensatoires (Damke et al., 1995). Il apparaît néanmoins que dans certaines conditions, certains récepteurs peuvent emprunter des voies différentes, telles les cavéoles. Ce comportement a été rapporté pour les récepteurs à la cholecystokinine (Roettger et al., 1995) ou à l'endothéline (Okamoto et al., 2000).

3.2.8 Trafic intracellulaire après endocytose

Si les premières étapes de l'endocytose sont relativement partagées pour tous les RCPG, une diversité est introduite à l'étape suivante (**Figure 11**). Certains récepteurs recyclent rapidement,

d'autres plus lentement, d'autres encore sont dirigés vers les lysosomes pour être dégradés (Gaborik and Hunyady, 2004). De nombreux mécanismes de tri déterminent la régulation du trafic intracellulaire des RCPG après endocytose. Juste après le détachement de la vésicule d'endocytose, le manteau de clathrine se désassemble et la vésicule fusionne avec les endosomes de tri. Cette étape commune à de nombreux récepteurs est généralement dépendante de la GTPase Rab5. Le ligand éventuel peut être détaché du récepteur par le pH acide régnant dans les endosomes de tri (pH~6.0). Si le ligand reste lié au récepteur, ceci favorise en général l'envoi du complexe récepteur-ligand vers les voies de dégradation. Depuis les endosomes de tri, le récepteur peut être directement recyclé à la membrane plasmique par une voie de recyclage rapide dépendante de Rab4, envoyé vers les endosomes de recyclage périnucléaires d'où il est recyclés par la voie du recyclage lent dépendante de Rab4 et Rab11, ou vers les endosomes tardifs par une voie de dégradation dépendante de Rab 7 (Rosenfeld et al., 2002; Seachrist and Ferguson, 2003) (**Figure 11**).

Les récepteurs rapidement recyclés vers la membrane plasmique depuis les endosomes de tri sont dit de classe A. Ils interagissent préférentiellement avec la β -arrestine 2 qui se dissocie rapidement après l'endocytose ; leur recyclage dépend de Rab4. On peut citer le récepteur β_2 AR (Seachrist et al., 2000), le récepteur à l'endothéline ETA-R (Bremnes et al., 2000), le récepteur opioïde μ (MOR). Les récepteurs de classe B possèdent une interaction avec les β -arrestines 1 et 2 et interagissent avec ces dernières de manière prolongée après l'endocytose (Oakley et al., 1999). Ces récepteurs, tels le récepteur de l'angiotensine II AT_{1a} (Dale et al., 2004), le récepteur de la vasopressine V2 (Innamorati et al., 2001), le récepteur muscarinique M_4 (Volpicelli et al., 2001) ou le récepteur somatostatine SSTR3 (Kreuzer et al., 2001) sont dirigés vers les endosomes de recyclage et recyclent de manière lente, souvent en interaction avec Rab11. Alternativement, certains récepteurs sont dirigés vers la voie de dégradation (endosomes tardifs et lysosomes) comme les récepteurs opioïdes δ et κ (Li et al., 2000; Tsao and von Zastrow, 2000), ou le récepteur des chemokines CXCR2 (Fan et al., 2003) dont le trafic vers les lysosomes dépend de Rab7. Un cas logique est celui de la dégradation systématique du récepteur PAR1, activé suite à la protéolyse de sa partie aminotermine et donc non réutilisable (Shapiro and Coughlin, 1998). Il faut garder à l'esprit que ces voies ne sont pas étanches et que les mécanismes de tri ne sont pas absolus : ainsi les récepteurs β_2 AR, qui recyclent rapidement, sont également détectés dans les voies de recyclage lent et dans les voies de dégradation (Moore et al., 1999).

3.2.9 Déterminants moléculaires du tri postendocytique

De nombreuses études ont été entreprises pour élucider ce qui détermine le devenir d'un RCPG après l'endocytose. La création de protéines chimères entre des récepteurs recyclés et dégradés a montré que la queue carboxyterminale contient le plus souvent les motifs déterminant le trafic des récepteurs. C'est le domaine d'interaction privilégié avec les β -arrestines, et on a vu que l'appartenance des RCPG à la classe A (faible interaction avec seulement β -arr1) ou à la classe B (interaction prolongée avec β -arr1 et β -arr2) détermine leur recyclage rapide ou lent (Oakley et al., 2000).

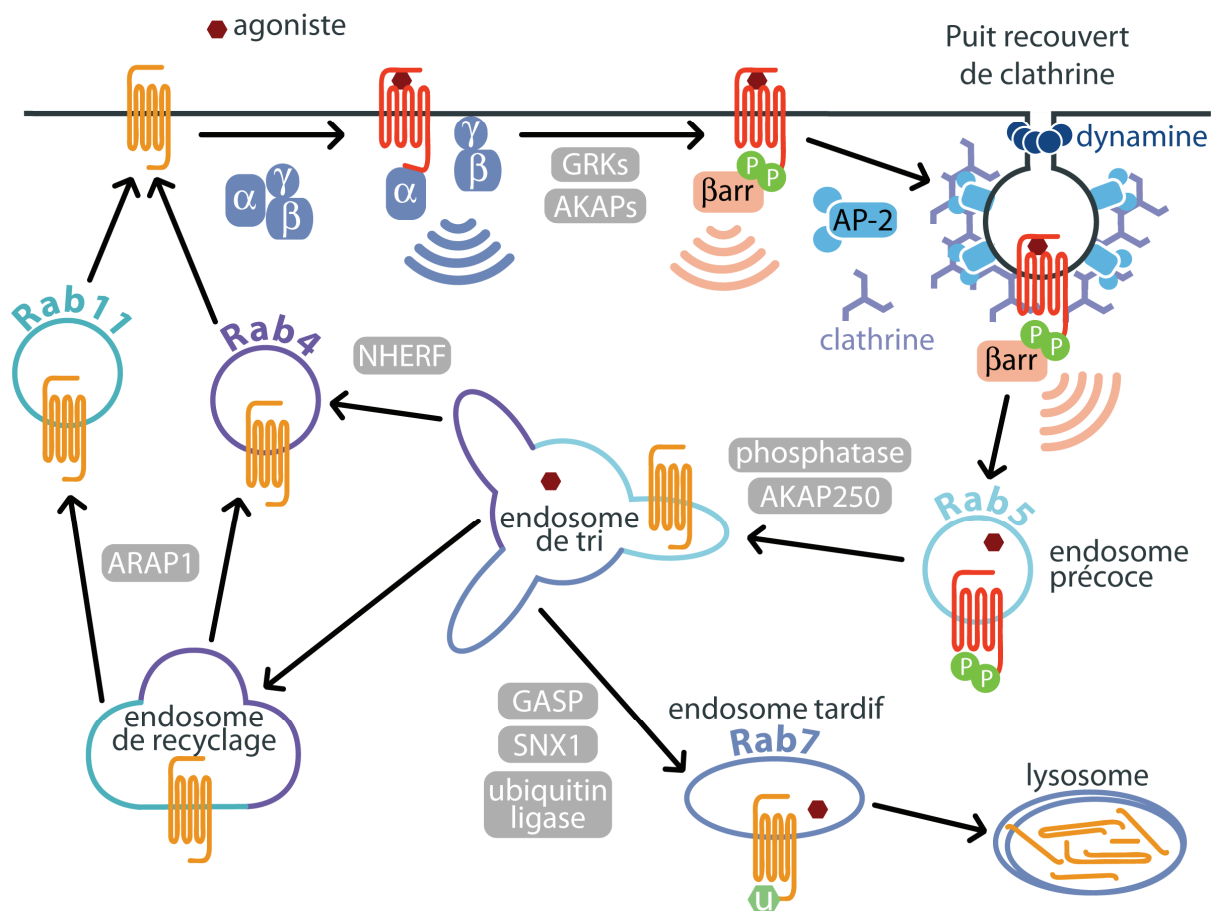


Figure 11 : Désensibilisation et trafic intracellulaire des RCPG

Le récepteur (orange) est activé par un agoniste (rouge). Les GRKs (gris) phosphorylent la queue carboxyterminale du récepteur (vert), permettant le recrutement des β -arrestines (rose) et découplant les protéines G (bleu). La clathrine et AP-2 sont recrutées et forment un puits recouvert de clathrine (en haut à droite) qui est séparé de la membrane plasmique par la dynamine (bleu marine). Les vésicules transitent par des voies dépendantes de Rab5 vers les endosomes de tri d'où ils repartent vers la membrane plasmique (recyclage médié par Rab4 et Rab11) par l'intermédiaire des endosomes de recyclage (en bas à gauche). Les récepteurs peuvent également être dirigés, parfois après ubiquitination (vert), vers la dégradation dans les lysosomes par la voie des endosomes tardifs dépendante de Rab7 (en bas à droite). Les différentes protéines intervenant dans le tri intracellulaires (gris) sont détaillées dans le texte.

Au-delà de ces interactions, des motifs facilitant le recyclage ont été élucidés : la séquence DSLI dans le β_2 AR constitue un motif PDZ susceptible d'interagir avec le NSF (*N-ethylmaleimide Sensitive Factor*) (Xiang and Kobilka, 2003) ou avec NHERF1 (*Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1*, Cao et al., 1999), ce qui favorise le recyclage rapide. La séquence LENLAE est déterminante pour le recyclage rapide du récepteur μ opioïde MOR (Tanowitz and von Zastrow, 2003). L'interaction avec des protéines partenaires peut également aider le recyclage par la voie lente, comme pour l'*Angiotensin Receptor Associated Protein 1* (ARAP1) (Guo et al., 2003) ou peut faciliter l'envoi vers la dégradation comme la *G-protein Associated Sorting Protein* (GASP) qui régule le ciblage du récepteur δ opioïde et interagit également avec β_2 AR, α_2 AR et D4 (Whistler et al., 2002). Pour le récepteur PAR1, une interaction avec la *Sorting NeXin 1* (SNX1) permet le routage vers les lysosomes (Wang et al., 2002). Plus étonnant, l'ubiquitination a été impliquée dans la modulation du tri des RCPG après endocytose (Wojcikiewicz, 2004). La mono ou poly-ubiquitination de la queue carboxyterminale des récepteurs β_2 AR et chemokine CXCR4 provoque leur routage vers les lysosomes (Marchese and Benovic, 2001; Shenoy et al., 2001). Les β -arrestines elle-même peuvent être ubiquitinylées, modulant le tri des RCPG auxquels elles s'associent (Shenoy and Lefkowitz, 2003).

4 Le récepteur cannabinoïque CB1

4.1 Historique

L'usage thérapeutique et récréatif d'extraits de *Cannabis Sativa*, sous forme de feuillage séché (marijuana) ou de résine (hachisch), existe chez l'homme depuis des millénaires. Cependant, la compréhension scientifique des effets du cannabis démarre véritablement à la fin des années 1960 avec l'isolement et la synthèse rationnelle du principal composé psychoactif du cannabis, le Δ^9 -THC, par Raphael Mechoulam et son équipe (Mechoulam et al., 1967; Mechoulam and Gaoni, 1967). Pendant les vingt années qui suivent, l'interrogation subsiste sur le mécanisme d'action du Δ^9 -THC au niveau cellulaire. Ce composé ainsi que les substances mimant ses effets (dits cannabinoïdes ou cannabimimétiques) étant très lipophile, l'hypothèse qui prédomine est un effet non spécifique par interaction avec la membrane plasmique, comme c'est le cas pour l'éthanol ou certains anesthésiques (Paton, 1975). Cependant, les effets de stéréosélectivité d'un analogue du Δ^9 -THC (Mechoulam et al., 1988), et la caractérisation d'une réponse aux cannabinoïdes médiée par l'adénylate cyclase dans les cellules neuroblastomes (Howlett and Fleming, 1984) apportent des arguments à l'existence d'un récepteur membranaire spécifique. La préparation de cannabinoïdes radiomarqués a permis de décrire pharmacologiquement ce récepteur (Devane et al., 1988). En 1990, dans le cadre d'une campagne de clonage de nouveaux récepteurs, une séquence codante est isolée à partir d'ADN complémentaire provenant de cortex cérébral de rat, en utilisant des amorces correspondant au récepteur bovin à la substance K (Matsuda et al., 1990). Le clone est identifié comme récepteur aux cannabinoïdes après criblage de nombreux ligands potentiels. Le récepteur est appelé récepteur cannabinoïque de type 1 ou CB1.

4.2 Biologie moléculaire de CB1

4.2.1 Phylogénie et structure génétique

Le récepteur CB1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires, long de 473 acides aminés chez le rat, possédant une longue queue aminoterminal extracellulaire de 117 acides aminés (**Figure 12A**). Les homologues chez l'homme (gène localisé sur le chromosome 6, Gerard et al., 1990) et la souris (gène localisé sur le chromosome 4, Chakrabarti et al., 1995) ont également été clonés, et le récepteur semble présent chez l'ensemble des vertébrés : mammifères, oiseaux,

amphibiens et poissons. Il n'a pas été cloné chez les reptiles et les poissons cartilagineux comme le requin, et semble absent chez les invertébrés : il n'y a pas de récepteur cannabinoïde chez la drosophile, *C. Elegans* ou la levure (Lutz, 2002).

Le récepteur est bien conservé entre les différentes espèces : CB1 humain possède 97 % d'identité avec le récepteur murin et 74 % avec le récepteur du poisson *Takifugu Rubripes* (**Figure 12B**). Un variant d'épissage alternatif possédant une queue aminoterminal plus courte de 62 acides aminés a été décrit chez l'homme et le rat (Shire et al., 1995), mais son existence a été remise en cause (Howlett et al., 2002). La structure du gène codant pour le récepteur CB1 a été étudiée chez l'homme et le rat : le gène comporte deux exons séparés par un intron d'environ 2 kilobases, le premier exon assez petit (120 bp) codant pour la région 5' non codante (5'UTR) et le deuxième exon codant pour l'ensemble de la protéine et le 3'UTR (Onaivi et al., 2002).

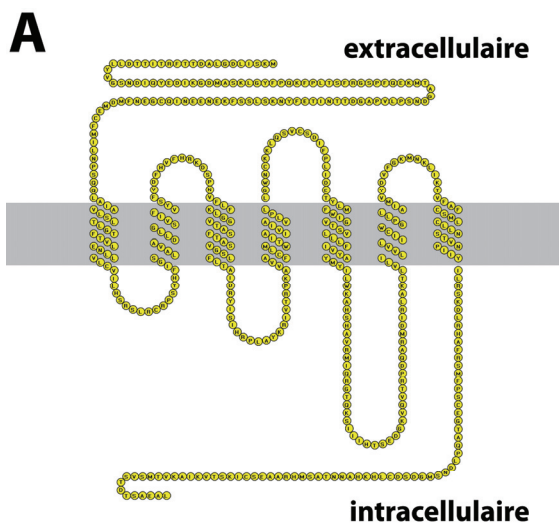
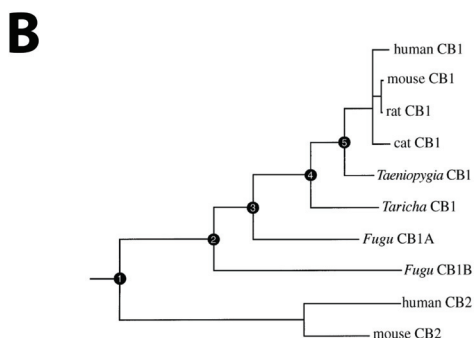


Figure 12 : Le récepteur cannabinoïque CB1

A/ Conformément à la topologie des R7TM, le récepteur CB1 possède sept segments transmembranaires, une longue queue aminoterminal extracellulaire et une queue carboxyterminale intracellulaire.



B/ Phylogénie des récepteurs cannabinoïques. On voit que les récepteurs CB1 mammifères sont issus d'un ancêtre commun relativement proche (en haut). D'après Egertova and Elphick, 2000.

4.2.2 Récepteur CB2 et récepteur putatif "CB3"

Un autre récepteur aux cannabinoïde a été cloné en 1992 : à la différence du récepteur CB1 qui est avant tout exprimé dans le système nerveux, le récepteur CB2 est exprimé dans les cellules

immunitaires : lymphocytes B et T, cellules tueuses, monocytes, macrophages, mastocytes et microglies. Cependant, des travaux récents suggèrent l'existence de récepteurs CB2 dans les neurones au niveau du tronc cérébral (Van Sickle et al., 2005). Ce récepteur possède 44 % d'identité avec CB1 chez l'homme et n'a pour le moment été cloné que chez l'homme, la souris et le rat (**Figure 12B**). Malgré cette homologie assez faible, ses caractéristiques pharmacologiques sont assez proches de celles de CB1 et la plupart des ligands classiques de CB1 sont capables de lier CB2.

La conservation de certains effets des agonistes et antagonistes cannabinoïdes chez la souris *knockout* pour CB1 ont amené à postuler l'existence d'autres récepteurs cannabinoïques, distincts de CB2 (Pertwee, 1999; Hajos and Freund, 2002). Ce récepteur « CB3 » a été caractérisé jusqu'à présent par des expériences pharmacologiques et électrophysiologiques indirectes, voire contradictoires (Howlett et al., 2002; Begg et al., 2005). Ces résultats pourraient refléter la nature lipophile des ligands cannabinoïdes et leur modulation de nombreux autres récepteurs et protéines membranaires, plutôt que l'existence de plusieurs récepteurs cannabinoïques encore inconnus.

4.3 Distribution de CB1

4.3.1 Autoradiographie

Le récepteur CB1 est surtout présent en quantité importante dans le système nerveux, avec des densités souvent supérieures à 1 pmol/mg de protéines, densités similaires à celles de récepteurs canaux au GABA ou au glutamate (Howlett et al., 2004). La distribution du récepteur a été étudiée à l'aide de techniques variées : autoradiographie, hybridation *in situ*, immunohistochimie (**Figure 13**). Les études autoradiographiques ont précédé le clonage du récepteur et ont été interprétées comme indice fort de l'existence d'un récepteur spécifique pour les cannabinoïdes (Herkenham et al., 1990). Elles montrent une importante densité de récepteurs au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'amygdale, des noyaux de la base et du cervelet, régions compatibles avec les effets comportementaux des cannabinoïdes (Herkenham et al., 1991; Glass et al., 1997) (**Figure 13A**). Le récepteur est également présent à des niveaux moindres dans l'hypothalamus et la moelle épinière. La comparaison du marquage entre différentes espèces (homme, singe et rat) montre une bonne conservation du patron d'expression avec quelques différences subtiles, comme un marquage relativement plus fort dans l'amygdale et le cortex cingulaire chez l'homme.

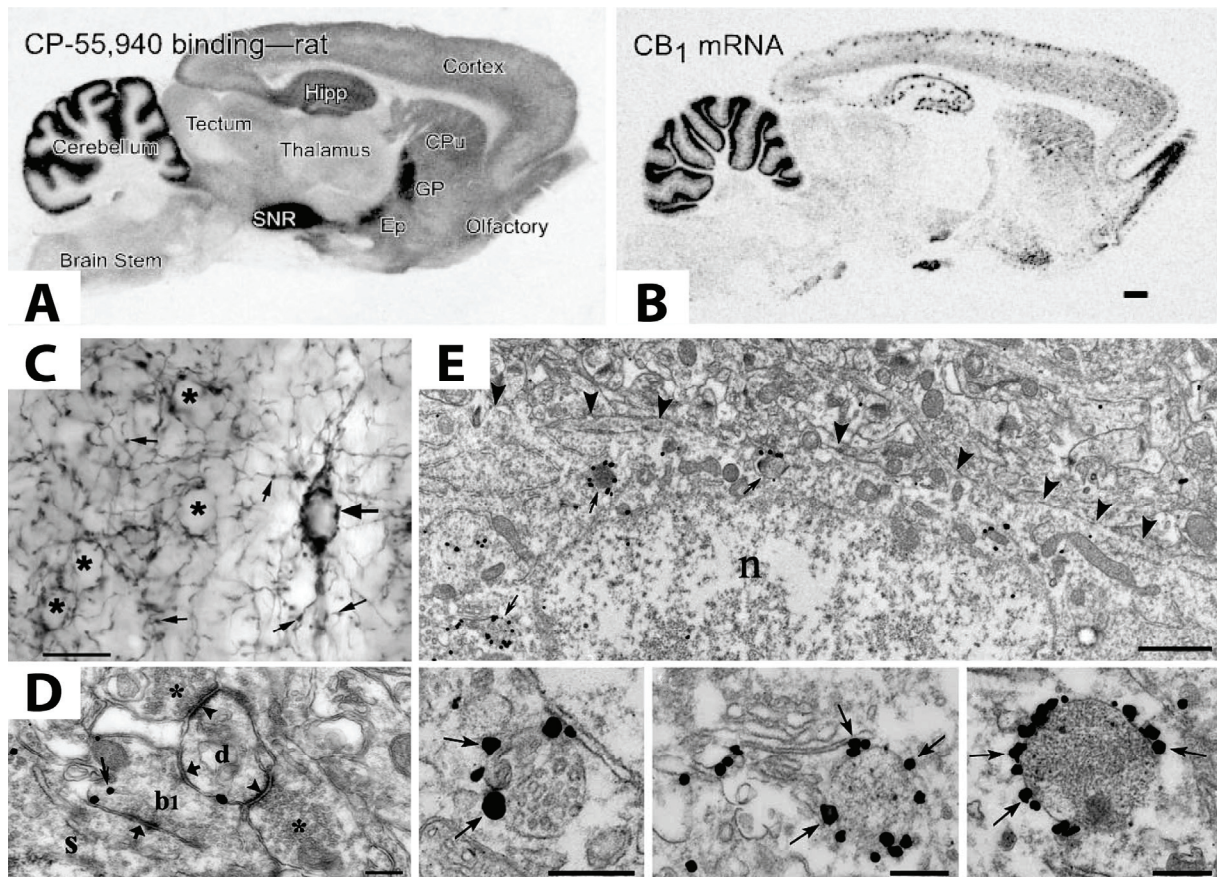


Figure 13 : Distribution des récepteurs CB1 dans le cerveau de rat

A/ Autoradiographie de la liaison du $[^3\text{H}]$ -CP55,940 montrant la distribution des sites de liaison du récepteur (d'après Freund et al., 2003). Le récepteur est présent en quantité importante au niveau du cortex, de l'hippocampe (Hipp), du cervelet et des noyaux de la base (SNR, substantia nigra pars reticulata). Abréviations : eP, aire entopédonculaire ; GP, globus pallidus ; CPU, caudate putamen.

B/ Hybridation *in situ*, montrant la distribution de l'ARNm codant pour CB1, d'après (Freund et al., 2003). Dans le cortex et l'hippocampe, le marquage moucheté montre des neurones positifs peu nombreux exprimant fortement l'ARNm.

Les images suivantes sont tirées de Bodor et al., 2005 et montrent la distribution subcellulaire de CB1 dans le néocortex du rat.

C/ Microscopie optique à fort grossissement montrant les récepteurs présents dans le corps cellulaire d'un neurone (soma, grande flèche à gauche) et le long de réseaux axonaux (petites flèches, à droite).

D/ Microscopie électronique à l'or colloïdal montrant le récepteur dans les terminaux présynaptiques, au niveau d'un bouton (b) contactant une dendrite non marquée (d) avec une synapse symétrique (tête de flèches). Cette dendrite est contactée par d'autres boutons non marqués (étoiles).

E/ Microscopie électronique à l'or colloïdal montrant les récepteurs au niveau du soma (membrane plasmique délimitée par des têtes de flèches, noyau n). Les récepteurs sont présents à la surface d'organelles intracellulaires (flèches) possédant une morphologie multivésiculaire (en bas à gauche), vésiculotubulaire (en bas au centre) ou lysosomale (en bas à droite).

4.3.2 Hybridation *in situ*

Les études d'hybridation *in situ* qui ont suivi le clonage du récepteur ont confirmé la localisation obtenue par autoradiographie, en tenant compte du fait que cette dernière détecte le récepteur en tant que protéine dans les corps cellulaires et le long des axones, tandis que l'hybridation détecte la présence d'ARN messagers dont la distribution est limitée aux corps

cellulaires (Mailleux et al., 1992; Matsuda et al., 1993) (**Figure 13B**). La comparaison de ces deux modes de détection a permis deux observations : la présence importante de la protéine le long des axones des neurones, mais aussi la différence marquée entre l'expression du récepteur dans le cortex et dans le cervelet. Dans le cortex et dans l'hippocampe, l'autoradiographie montre une liaison uniforme axonale dans les couches des neurones pyramidaux, tandis que l'hybridation montre que seul un nombre limité de neurones expriment très fortement le récepteur. Dans le cervelet en revanche, la distribution par autoradiographie et par hybridation *in situ* montre des récepteurs exprimés uniformément dans la quasi-totalité des cellules granulaires (**Figure 13B**).

4.3.3 Immunocytochimie

L'obtention d'anticorps contre le récepteur CB1 a permis d'effectuer des études immunohistochimiques de la localisation de la protéine. Ces travaux, effectués avec des anticorps contre la partie carboxyterminale (Egertova and Elphick, 2000) ou aminotermine (Pettit et al., 1998; Tsou et al., 1998; Moldrich and Wenger, 2000) du récepteur CB1 ont confirmé les distributions obtenues par autoradiographie et hybridation *in situ*, notamment l'expression importante du récepteur le long des axones (**Figure 13C**). Les études de colocalisation ont montré que les récepteurs étaient localisés dans les neurones GABAergiques inhibiteurs exprimant la cholecystokinine CCK (Tsou et al., 1999). Des études de microscopie électronique utilisant les anticorps anti-CB1 et l'or colloïdal, notamment celles du groupe de Tamas Freund à Budapest (Katona et al., 1999; Hajos et al., 2000; Katona et al., 2000), ont permis de préciser la localisation subcellulaire des récepteurs dans les interneurones GABAergiques. À l'origine, l'accent a été porté sur la distribution du récepteur à la surface des axones, au niveau des boutons présynaptiques, mais en dehors de la zone active (**Figure 13D**). Cependant, les résultats récents mettent également en avant la présence du récepteur dans des endosomes somatodendritiques ou axonaux, ainsi qu'une expression importante le long des troncs axonaux, même dans les parties de l'axone éloignées des spécialisations présynaptiques (Morozov and Freund, 2003; Bodor et al., 2005; Nyiri et al., 2005; Matyas et al., 2006) (**Figure 13E**). Dans le striatum, la localisation de CB1 par microscopie électronique a révélé une localisation moins ciblée, comportant des récepteurs présents au niveau présynaptique et postsynaptique, ainsi que dans les astroglies périvasculaires (Rodriguez et al., 2001; Pickel et al., 2004).

4.4 Ligands de CB1

Depuis la découverte de la structure du Δ^9 -THC, de nombreux ligands du récepteur CB1 ont été synthétisés et certaines substances endogènes liant le récepteur ont été isolées. Les ligands ont été classés selon leur structure chimique et leur activité pharmacologique sur les récepteurs CB1 et CB2 (Mechoulam and Hanus, 2000) (**Figure 14**).

4.4.1 Cannabinoïdes classiques

Cette classe regroupe notamment les substances contenues dans les extraits de *Cannabis Sativa* qui lient le récepteur CB1 comme le Δ^9 -THC. Ce composé lie le récepteur CB1 avec une affinité assez faible ($K_i \sim 40$ nM) et une efficacité limitée, ce qui le qualifie comme agoniste partiel faible (les K_i sont tirés de Palmer et al., 2002). D'autres molécules synthétiques dérivées du Δ^9 -THC comme le HU-210 montrent une affinité et une efficacité très supérieures ($K_i = 0.73$ nM), ainsi qu'une stéréosélectivité plus marquée (Mechoulam et al., 1988).

4.4.2 Cannabinoïdes non classiques

Ces composés, qui ne contiennent pas le cycle dihydropyranne du Δ^9 -THC, ont été synthétisés par Pfizer et ont comme principal représentant le CP-55940 ($K_i = 0.6$ nM) (Little et al., 1988). Cette molécule, moins lipophile que le Δ^9 -THC, a été la première à permettre la caractérisation du récepteur CB1 (Devane et al., 1988) et la forme tritiée est encore le radioligand du récepteur CB1 le plus utilisé aujourd'hui.

4.4.3 Aminoalkylindoles

Ce furent les premières molécules actives sur les récepteurs CB1 et CB2 ne possédant pas d'analogie avec le Δ^9 -THC (Pacheco et al., 1991). Le prototype de cette famille, le R-(+)-WIN55,212-2 ($K_i = 1.89$ nM) (D'Ambra et al., 1992) est un agoniste total des récepteurs CB1 et CB2 largement utilisé. Bien que certains résultats de mutagénèse semblent montrer que le site de liaison du WIN sur le récepteur CB1 est différent de celui des autres ligands, le WIN déplace efficacement tous les ligands radiomarqués de CB1, agonistes ou antagonistes.

4.4.4 Cannabinoïdes endogènes et leurs dérivés : eicosanoïdes

Ce sont des dérivés d'acide gras qui ont été découverts par fractionnement d'extraits de tissus et test de l'activité des fractions sur le récepteur CB1. Les agonistes endogènes découverts à ce jour sont l'anandamide (AEA), dont le nom provient du mot sanskrit « ananda » qui signifie « plaisir »

(Devane et al., 1992), l'homo- γ -linolenoyléthanolamide et le docosatetraenoyléthanolamide qui sont des analogues de l'anandamide (Hanus et al., 1993), le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) et le 2-arachidonyl glyceryl ether ou noladin ether (Hanus et al., 2001). Les deux ligands endogènes les plus étudiés sont l'AEA et le 2-AG.

L'AEA est un composé présentant un profil pharmacologique d'agoniste partiel ($K_i=89$ nM) proche du Δ^9 -THC. Il est hydrolysé *in vivo* en acide arachidonique et en éthanolamine par une enzyme microsomale appelée *Fatty Acid Amide Hydrolase* (FAAH) (Cravatt et al., 1996). L'utilisation de l'AEA implique l'ajout d'un inhibiteur des protéases comme le phénylméthylsulfonyl fluoride pour la protéger de l'hydrolyse. Alternativement, l'utilisation du dérivé méthylé R-(+)-méthanandamide permet d'éviter l'hydrolyse (Abadji et al., 1994). Il faut également noter que l'AEA possède des effets modulateurs sur de nombreux récepteurs et canaux comme les récepteurs nicotiques $\alpha 7$, les canaux calciques type T, certains canaux potassiques, et le récepteur vanilloïde (*Transient Receptor Potential Vanilloid type 1* TRPV1), ce qui en fait un ligand endogène spécifique de CB1 assez suspect (van der Stelt and Di Marzo, 2005b). En particulier, les effets comportementaux de l'AEA ne sont que partiellement absents chez la souris CB1 *knockout*, contrairement aux effets du Δ^9 -THC (Di Marzo et al., 2000). Une question non encore résolue concerne le mode de transport de l'AEA. En effet, la plupart des cellules sont capables d'importer l'AEA extracellulaire, et de nombreuses études ont postulé l'existence d'un transporteur protéique spécifique, tandis que d'autres favorisent l'hypothèse d'une diffusion passive à travers la membrane plasmique, maintenue grâce à l'hydrolyse intracellulaire par la FAAH (Glaser et al., 2005). Cependant, l'existence d'inhibiteurs spécifiques de ce transporteur putatif semble renforcer l'hypothèse de la nature protéique du transporteur de l'AEA (Moore et al., 2005).

Le 2-AG est un ligand actif sur les récepteurs CB1 et CB2, avec une affinité inférieure à celle de l'anandamide ($K_i=472$ nM pour CB1), mais une efficacité supérieure. Sa synthèse est réalisée par hydrolyse du diacylglycérol DAG sous l'action des sn1-DAG lipases (Bisogno et al., 2003), et son hydrolyse est effectuée par la monoglycéride lipase (MGL) (Dinh et al., 2002). Cependant, l'hydrolyse du 2-AG *in vivo* est freinée par sa coexistence avec de nombreuses molécules apparentées, esters d'acides gras dont la concentration est plus élevée que le 2-AG lui-même, mais qui sont inactives sur le récepteur CB1. C'est ce que l'on appelle l'effet « d'entourage » (Ben-Shabat et al., 1998).

4.4.5 Antagonistes du récepteur CB1

À la différence des molécules citées ci-dessus qui sont toutes des agonistes totaux ou partiels, des composés ont été caractérisés qui possèdent une activité antagoniste sur le récepteur

CB1, et même, compte tenu de son activité constitutive, des propriétés d'agoniste inverse. Le premier composé de cette série, le SR141716A ($K_i=11.5$ nM) a été synthétisé par l'équipe de Gérard Le Fur à Sanofi Recherche (Rinaldi-Carmona et al., 1994). D'autres molécules diazypyrazoles analogues commercialement disponibles existent comme l'AM251 et l'AM281 ($K_i=7.5$ et 12 nM, respectivement), développés à l'origine comme marqueurs pour l'étude du récepteur CB1 en *Single Photon Emission Computing Tomography* (SPECT, Gatley et al., 1996; Gatley et al., 1997; Gatley et al., 1998).

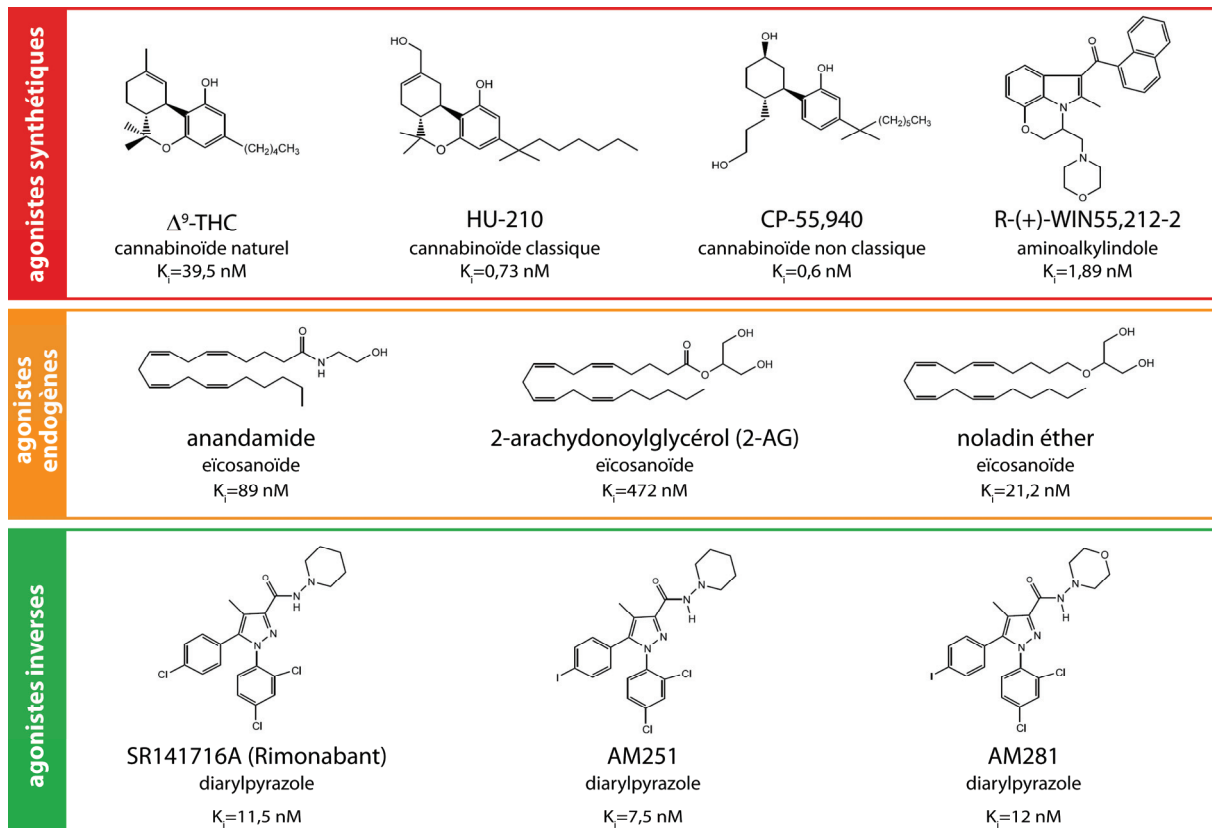


Figure 14 : Structure chimique des ligands du récepteur CB1

Les valeurs d'affinité (K_i) sont tirées de Palmer et al., 2002. Les ligands sont répartis en trois catégories : les agonistes naturels ou de synthèse (orange), les agonistes endogènes (orange) et les antagonistes/agonistes inverses (vert).

4.5 Essais d'activité pour CB1

4.5.1 Effets *in vivo*

Pour tester l'effet de ces ligands et leur spécificité, des essais ont été développés *in vivo* et *in vitro*. Les effets comportementaux des cannabinoïdes sont souvent complexes et dépendants des espèces. La difficulté de mettre en place des tests chez l'homme (à cause des inconnues en matière

de toxicité des dérivés synthétisés) a amené à définir des tests comportementaux standardisés chez l'animal, permettant de déceler et de quantifier une activité cannabinoïde spécifique (Howlett et al., 2002). Historiquement, les études ont d'abord porté sur l'« ataxie statique » (balancement du corps sans déplacement) provoquée chez le chien par les cannabinoïdes, puis sur les altérations comportementales (sédation, ptose) chez le singe. Citons également les tests de discrimination chez le rat ou chez le singe permettant de déceler si un composé est perçu comme différent ou identique à un composé de référence par l'animal ou encore les tests basés sur l'altération de la mémoire. Enfin, le modèle de la tétrade d'effets chez la souris permet d'isoler une combinaison de réactions unique aux composés cannabimimétiques : sédation, hypothermie, antinociception et catalepsie.

4.5.2 Essais *in vitro*

In vitro, différents tests utilisent les étapes successives d'activation du récepteur CB1 pour détecter l'activité d'un ligand. Les mesures de liaison (*binding*) évaluent le déplacement d'un ligand radiomarqué par le ligand dont on veut connaître l'affinité pour le récepteur CB1. Cette expérience est réalisée sur des membranes, préparées soit à partir de cellules transfectées avec le récepteur, soit à partir d'homogénat de cerveau, organe exprimant naturellement de grandes quantités du récepteur CB1. La méthode du [³⁵S]GTPγS exploite le couplage du récepteur CB1 aux protéines G, en mesurant l'augmentation d'affinité de la protéine G pour le GTP après activation du récepteur CB1 par un agoniste. Une variante utilisant l'ajout progressif de GDP permet de mesurer l'efficacité intrinsèque du ligand, c'est-à-dire sa capacité à stimuler le couplage entre le récepteur et la protéine G. La méthode de l'inhibition de l'AMPC utilise le couplage négatif du récepteur CB1 à l'adénylate cyclase pour mesurer les capacités de liaison des composés (voir plus bas, 4.6.1). Enfin, l'utilisation de muscles isolés et la mesure de l'inhibition de la contraction évoquée électriquement constitue un test très sensible de l'activité cannabinoïde, à condition de vérifier l'implication spécifique des récepteurs CB1 par l'inhibition des effets au moyen de composés antagonistes comme le SR141716A.

4.6 Voies de signalisation de CB1

Certains des essais présentés ci-dessus exploitent la voie canonique du couplage des récepteurs CB1 : protéine G_{i/o}, inhibition de l'adénylate cyclase et de la production d'AMPC. Cette voie était décrite avant même le clonage du récepteur CB1 (Howlett and Fleming, 1984). Après le clonage du récepteur, la possibilité d'exprimer le récepteur CB1 dans des systèmes d'expression hétérologues a permis d'élucider dans le détail les voies de signalisation intracellulaire impliquées

dans l'action du récepteur. La transduction du signal effectuée par le récepteur CB1 peut se décomposer selon plusieurs voies détaillées ci-après (**Figure 15**).

4.6.1 Régulation de l'adénylate cyclase (AC)

L'inhibition de l'AC est la voie de signalisation de CB1 la mieux caractérisée, présente dans les tissus cérébraux, les cellules neuronales et les modèles d'expression hétérologues. En particulier, cette voie a été mise en évidence dans des cultures de neurones corticaux, proches des cultures neuronales que nous avons utilisées (Jung et al., 1997). Cette inhibition est sensible à la toxine pertussique, indiquant l'implication de protéines $G_{i/o}$. Plus précisément, les trois sous-types de sous-unité α_i semblent en mesure d'interagir avec CB1, mais les domaines d'interaction sont distincts (Mukhopadhyay and Howlett, 2001). L'inhibition de l'AC provoque une diminution de la production d'AMPC (Howlett, 2004). Cependant, si l'on bloque l'inhibition de l'AC en neutralisant les $G_{i/o}$ avec la toxine pertussique, une réponse stimulatrice de l'AC par la protéine G_s est détectée (Glass and Felder, 1997; Bonhaus et al., 1998). Les isoformes d'AC impliquées dans ces réponses antagonistes semblent différents, comme l'on montré la mesure de l'AMPC dans des cellules cotransfectées avec les récepteurs CB1 et des isoformes distincts des ACs (Rhee et al., 2000).

4.6.2 Régulation des canaux ioniques

En aval de l'adénylate cyclase, la production d'AMPC régule l'activité de la Protéine Kinase A. Cette dernière régule la phosphorylation des canaux ioniques au potassium, provoquant l'activation de courants potassiques de type A (Childers and Deadwyler, 1996). Le récepteur CB1 peut également activer les canaux potassiques K_{ir} par le biais des protéines $G_{i/o}$ lorsqu'il est exprimé dans cellules AtT-20 (Mackie et al., 1995) ou dans l'oocyte de xénope (McAllister et al., 1999). Les canaux calciques de type L, N, P et Q sont également régulés par l'activation de CB1. Notamment, les canaux calciques de type N sont inhibés par CB1 dans les cellules neuronales (Mackie and Hille, 1992; Pan et al., 1996).

4.6.3 Régulation du calcium intracellulaire

Dans les neuroblastomes N18TG2, les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G sont couplées à la phospholipase C β (PLC- β), amenant la production d'IP $_3$ et provoquant un pic de la concentration de calcium intracellulaire. Cette voie est particulièrement activée par le 2-AG, et moins par les autres agonistes de CB1 (Howlett and Mukhopadhyay, 2000). Des résultats récents indiquent que l'agoniste WIN est susceptible d'induire une augmentation du calcium intracellulaire dans les

cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur CB1. Ce phénomène implique l'activation de CB1, des protéines $G_{q/11}$ et la voie PLC- β /IP₃/calcium (Lauckner et al., 2005).

4.6.4 Régulation des MAP kinases et du céramide

L'activation du récepteur CB1 peut stimuler la phosphorylation de la FAK dans les tranches hippocampales. Cette phosphorylation dépend de $G_{i/o}$ et de l'activité de la PKA, montrant l'implication de la voie adénylate cyclase (Derkinderen et al., 1996). L'implication de la kinase Fyn associée à FAK^{6,7} dans ce processus a également été mise en évidence (Derkinderen et al., 2001). De plus, l'activation du récepteur CB1 par les agonistes endogènes ou le Δ^9 -THC provoque une activation des voies ERK par le biais des MAP/ERK kinases (MEK, Derkinderen et al., 2003). Cette voie ne dépend pas de la PI3-Kinase mais semble sous le contrôle des variations de l'AMPc. Les MAPK sont également activées en aval de CB1 : p38 (Rueda et al., 2000), p42/p44 dans les cellules CHO exprimant CB1 (Bouaboula et al., 1995b) ou dans les gliomes C6 et les cultures astrocytaires (Sanchez et al., 1998), et ERK2 dans les fibroblastes WU38 (Wartmann et al., 1995).

Dans certains cas la voie d'activation des MAPK est dépendante de la PI3-Kinase (Bouaboula et al., 1995b; Wartmann et al., 1995), et l'on pourrait postuler une voie liant les sous-unités $\beta\gamma$ à l'activation de la PI3-Kinase, l'activation de Raf-1 et la phosphorylation des MAPK. En aval des MAPK, on trouve la régulation de l'échangeur Na^+/H^+ NHE1 (Bouaboula et al., 1999b), et dans les cas des cellules WU38 le circuit phospholipase A2 \rightarrow largage d'acide arachidonique \rightarrow synthèse de prostaglandine E (Wartmann et al., 1995). Dans les cellules astrocytaires, la voie $G_{i/o}$ \rightarrow PI3-Kinase active la protéine kinase B/Akt (Gomez del Pulgar et al., 2000), ce qui pourrait induire l'inhibition de la glycogène syntase kinase 3 (GSK3) et provoquer l'augmentation du métabolisme du glucose observée (Guzman and Sanchez, 1999). Enfin cette augmentation du métabolisme du glucose, de la synthèse des phospholipides et du glycogène dépend d'une voie passant par la protéine adaptatrice Fan (*Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase*), l'activation de la sphingomyélinase, la production de céramide et activation de la voie Raf1-MAPK. Cette voie a été associée à un effet antiprolifératif et antiapoptotique dans les cellules C6 (Guzman et al., 2001).

4.6.5 Régulation des gènes immédiats précoces et de la synthèse protéique

En aval des MAPK, l'activité de CB1 peut provoquer l'expression de gènes précoces immédiats : krox24 en aval de p42/p44 (Bouaboula et al., 1995a), c-Fos, Zif68 et BDNF en aval de ERK (Derkinderen et al., 2003), et les c-Jun N-terminal kinases JNK1 et JNK2 en aval de p38 (par une voie $G_{i/o}$ /PI3-Kinase/Ras) (Rueda et al., 2000). L'effet de l'activité de CB1 sur l'expression

protéique a été constaté : diminution d'expression des récepteurs à la prolactine et des récepteurs tyrosine kinase aux neurotrophines Trk par le biais d'une voie qui fait intervenir la PKA et l'activation des MAPK, amenant finalement un effet antiprolifératif dans certains modèles de cancer du sein (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999).

4.6.6 Régulation de la *Nitric Oxyde Synthase* (NOS)

L'activation de CB1 peut provoquer une inhibition de la synthèse du monoxyde d'azote NO en agissant soit sur l'enzyme neuronale de synthèse du NO (nNOS) dans les cellules granulaires du cervelet (Hillard et al., 1999) ou sur l'enzyme inducible de synthèse du NO (iNOS) dans les microglies (Waksman et al., 1999). Cet effet sur la production du NO pourrait avoir un rôle neuroprotecteur contre l'excitotoxicité, c'est-à-dire la mort neuronale induite par une suractivité neuronale (Kim et al., 2005).

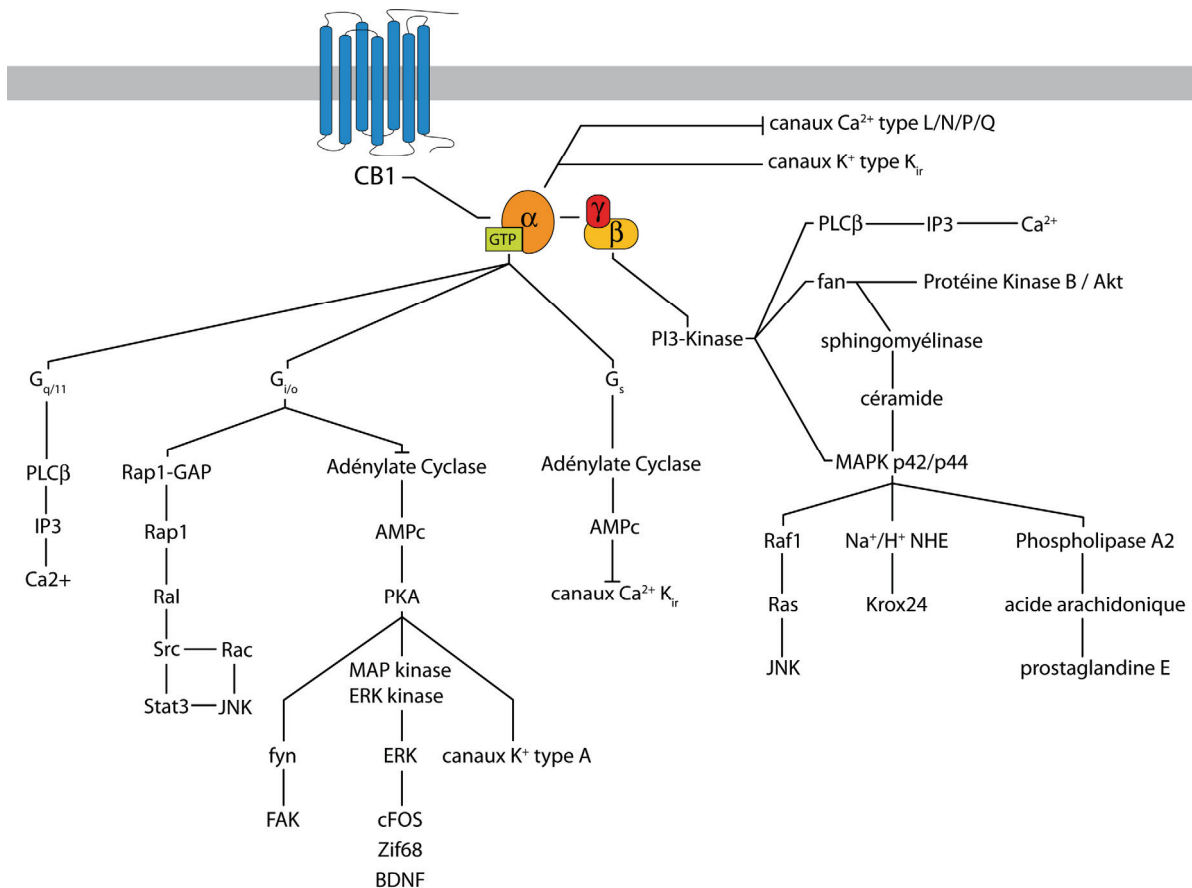


Figure 15 : Signalisation intracellulaire en aval du récepteur CB1

De nombreuses études ont révélé différentes voies de signalisation présentées ci-dessus. On rappelle les voies les mieux connues, confirmées par plusieurs travaux :

- le récepteur CB1 peut activer directement les canaux potassiques et inhiber les canaux calciques (en haut) ;
- le couplage à la protéine $G_{\alpha_{i/o}}$ régule négativement l'AMPC et la PKA ;
- les sous-unités $G_{\beta\gamma}$ interagissent avec la PI3-Kinase pour activer les MAP kinases.

4.7 Rôles de CB1

L'étonnante quantité de récepteurs CB1 exprimés dans le système nerveux suggère que ceux-ci jouent un rôle important, et de nombreuses études ont été entreprises pour cerner ce rôle. Notamment, deux lignées de souris *knockout* ont été réalisées indépendamment (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999), avec des résultats comportementaux parfois contradictoires montrant le rôle de CB1 dans l'implantation embryonnaire, l'activité locomotrice, l'analgésie, l'addiction, la mémoire et la prise de nourriture (Lutz, 2002). Au niveau moléculaire et cellulaire, les études ont montré l'implication de CB1 dans la modulation de la neurotransmission (Freund et al., 2003), de la douleur (Pertwee, 2001), de la neuroprotection (Grundy et al., 2001), de l'addiction, et de la prise de nourriture (Mackie, 2005).

4.7.1 Neurotransmission

Les effets des cannabinoïdes sur la libération de neurotransmetteurs ont été mis en évidence dès le début des années 1970 par le biais des réponses d'organes isolés. Les trente années qui ont suivi ont confirmé ces effets par différents moyens d'étude : tissus perfusés, réponse d'organes isolés, altération du rythme cardiaque ou de la pression artérielle chez l'animal entier. La plupart des systèmes de neurotransmission classiques sont susceptibles d'être modulés par les cannabinoïdes : acétylcholine, GABA, noradrénaline, substance P, glutamate (Schlicker and Kathmann, 2001). L'effet généralement constaté est une inhibition de la libération par les agonistes cannabinoïdes, et beaucoup d'études ont montré l'antagonisation de cet effet par le SR141716A, indiquant l'implication du récepteur CB1. Quelques cas de stimulation de la libération ont été reportés, notamment pour la dynorphine dans la moelle épinière, la dopamine dans le nucleus accumbens ou le glutamate dans le cortex, mais ces exceptions sont probablement dues à des effets indirects de la stimulation du récepteur CB1 (Howlett et al., 2002). De manière générale on peut penser que les récepteurs CB1 présynaptiques exprimés dans un neurone donné sont susceptibles de réguler directement la libération du neurotransmetteur émis par ce neurone.

4.7.2 DSI et DSE

Au-delà de l'application exogène d'agonistes cannabinoïdes, le récepteur CB1 est également impliqué dans un mécanisme de régulation synaptique déclenché par l'activité du neurone postsynaptique. Ce phénomène est appelé *Depolarization induced Supression of Inhibition* (DSI) pour les synapses GABAergiques et *Depolarization Induced Suppression of Excitation* (DSE) pour

les synapses glutamatergiques (**Figure 16**). La DSI est un phénomène d'abord décrit par des travaux d'électrophysiologie au début des années 1990 (Llano et al., 1991; Pitler and Alger, 1992). Une stimulation brève d'un neurone (cellule pyramidale de l'hippocampe ou cellule de Purkinje dans le cervelet) entraîne une suppression transitoire des événements synaptiques GABAergiques dans ce même neurone (**Figure 16A**). Cet effet est présynaptique (libération de GABA depuis le neurone ciblant le neurone excité), bien que son origine soit postsynaptique (excitation du neurone), ce qui implique une signalisation rétrograde rapide qui « remonte » la synapse pour moduler la libération du GABA (Alger et al., 1996). Dans l'hippocampe, cet effet est spécifique des synapses GABAergiques tandis que dans le cervelet, il existe également dans les synapses glutamatergiques excitatrices (et est alors appelé DSE). Dès 2001, le blocage expérimental de la DSI et de la DSE par des antagonistes des récepteurs CB1 a démontré le rôle du système cannabinoïque dans ce phénomène (Kreitzer and Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001). Il a été postulé que l'excitation du neurone cible provoque l'ouverture de canaux calciques (canaux de type N contrôlés par le voltage ou VCC) et l'augmentation du calcium intracellulaire postsynaptique (**Figure 16B**). Ceci provoque la synthèse d'endocannabinoïdes (anandamide, 2-AG) clivés à partir de la membrane plasmique postsynaptique. Alternativement, l'activation de récepteurs métabotropiques au glutamate mGluR1 peut également déclencher cette production d'endocannabinoïdes (Maejima et al., 2001). Les endocannabinoïdes traversent la synapse à rebours et activent les récepteurs CB1 présynaptiques. L'identité de l'endocannabinoïde impliqué est inconnue, même si les effets sur la DSI de l'inhibition de la FAAH, qui dégrade sélectivement l'anandamide, ou de COX2, qui dégrade l'anandamide et le 2-AG, indiquent que le médiateur serait plutôt le 2-AG (Alger, 2005).

L'activation du récepteur CB1 permet la régulation des canaux calciques directement par les sous-unités $\beta\gamma$ (voir ci-dessus), provoquant une diminution du calcium intracellulaire, donc une baisse de probabilité de la libération du GABA vésiculaire (Wilson and Nicoll, 2002). En parallèle à cette activation directe, la diminution du calcium intracellulaire présynaptique ferait intervenir les canaux potassiques (Daniel et al., 2004) (**Figure 16B**). Cette régulation en retour à l'échelle synaptique a été proposée comme base à des formes de plasticité impliquant différentes synapses d'un même neurone, comme la *Long Term Potentiation* (LTP, Carlson et al., 2002). Cependant, les conditions d'excitation du neurone cible utilisées dans les études de la DSI et de la DSE sont drastiques et peu probables *in vivo*. La pertinence physiologique de ces phénomènes a donc été discutée (Freund et al., 2003), voire remise en cause (Hampson et al., 2003).

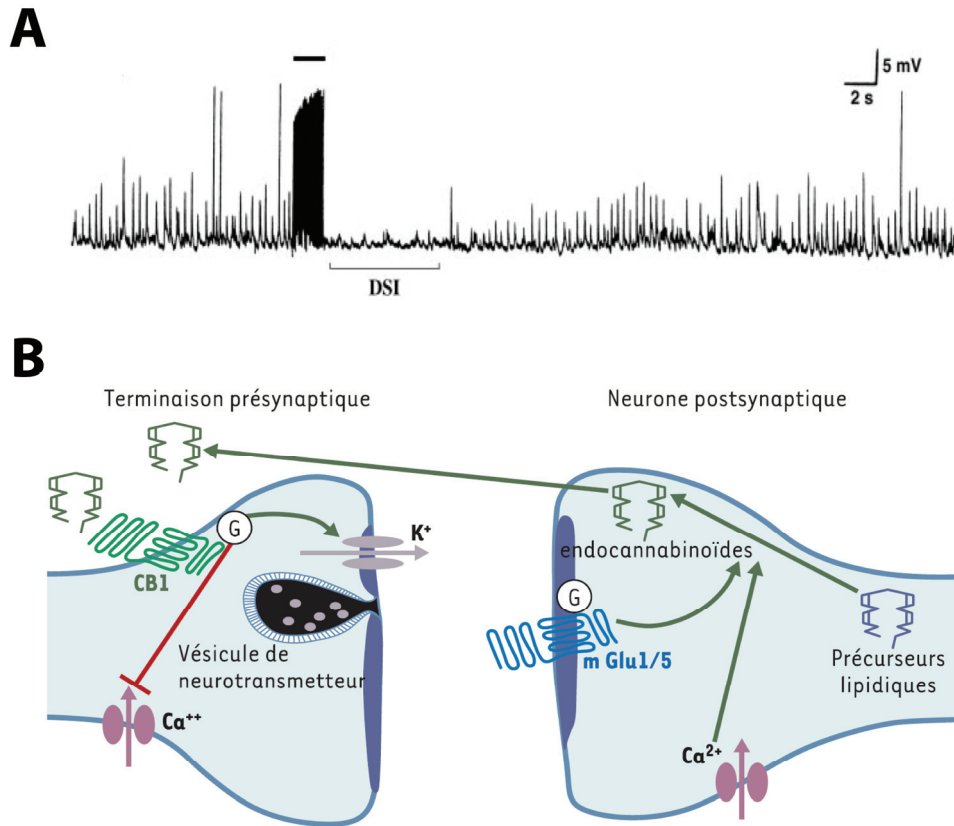


Figure 16 : Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI)

A/ Si l'on stimule un neurone pyramidal de l'hippocampe (barre noire), on observe juste après la stimulation une inhibition des courants spontanés inhibiteurs qui dure quelques secondes (intervalle noté « DSI »). D'après Wilson and Nicoll, 2002.

B/ Le mécanisme de ce phénomène fait intervenir la libération d'endocannabinoïdes par le neurone postsynaptique, sous l'effet de l'élévation du calcium intracellulaire ou de l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGlu1/5). Les endocannabinoïdes traversent la synapse à rebours pour venir activer les récepteurs CB1 présynaptiques, inhibant l'entrée de calcium intracellulaire et la sortie de potassium, et donc diminuant le largage des neurotransmetteurs. D'après Scott et al., 2004.

4.7.3 Douleur

Les études pharmacologiques ont montré que l'activation du récepteur CB1 par des agonistes peut réduire la sensibilité à la douleur dans de nombreux tests de nociception, pour des modèles de douleur aiguë ou chronique, neuropathique ou inflammatoire (Cravatt and Lichtman, 2004). Ces effets sont médiés au niveau du système nerveux central : modulation des interneurons GABAergiques dans le *periaqueducal gray* (PAG) et la *rostral ventrolateral medulla* (RVM) (Wilson and Nicoll, 2002), mais aussi au niveau de la moelle épinière et dans les nerfs périphériques (Hohmann, 2002). L'autre récepteur cannabinoïque, CB2, intervient également dans la modulation de la douleur, particulièrement au niveau de la peau et des microglies de la moelle épinière.

4.7.4 Neuroprotection & excitotoxicité

Dans les accidents vasculaires cérébraux ainsi que durant certaines phases des maladies neurodégénératives, la mort des cellules nerveuses est la conséquence d'une sur-stimulation par le glutamate en excès. Ce phénomène est appelé excitotoxicité, et provoque une augmentation toxique du calcium, suivie de l'activation des voies de destruction cellulaire : caspases, calpaïnes, espèces à oxygène réactif. Plusieurs études ont montré un rôle protecteur des cannabinoïdes dans des modèles d'excitotoxicité (van der Stelt and Di Marzo, 2005a). Selon les modèles étudiés, les cannabinoïdes protègent les neurones de l'excitotoxicité par inhibition de la libération de glutamate, fermeture des canaux calciques sensibles au voltage VCC, activité antioxydante, inhibition de la formation du facteur proinflammatoire TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) ou induction de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1. Les effets des neuroprotecteurs d'endocannabinoïdes comme l'AEA pourraient également dépendre de la modulation par l'AEA des récepteurs canaux vanilloïdes TRPV1. *In vivo*, les cannabinoïdes peuvent également posséder des effets neuroprotecteurs. Les niveaux d'AEA et de 2-AG augmentent brutalement après un épisode traumatique cérébral, et certaines souris CB1 knockout sont plus sévèrement atteintes et récupèrent moins bien que les souris sauvages après un tel épisode (Parmentier-Batteur et al., 2002; Marsicano et al., 2003). Cependant, les substances cannabinoïdes peuvent également se montrer inefficaces, voire exacerber les dommages provoqués un épisode d'excitotoxicité.

4.7.5 Addiction

Même si le caractère addictif du Δ^9 -THC chez l'homme est âprement discuté, certains protocoles comportementaux chez l'animal dévoilent une dépendance aux substances cannabinoïdes et un phénomène de sevrage (Mackie, 2005). Parallèlement, de nombreuses études ont démontré un lien entre les endocannabinoïdes et l'addiction aux autres drogues. Ainsi, il existe une relation réciproque entre les cannabinoïdes et les opioïdes : le blocage de CB1 ou son élimination génétique atténue les effets sur le renforcement lié aux opioïdes. Des interactions avec les circuits de l'héroïne, de la nicotine et de l'alcool ont été décrites, l'activité de CB1 renforçant en général le caractère addictif de ces substances.

4.7.6 Prise de nourriture

Chez l'homme, l'effet appétant de la consommation de cannabis est bien connue. Chez l'animal, le blocage de l'activité de CB1 induit une diminution de la prise de nourriture et une perte de poids, surtout chez les animaux rendus obèses par un régime spécifique (Mackie, 2005). Cet effet

semble médié par des effets périphériques au niveau du métabolisme des graisses dans les adipocytes, favorisant la lipolyse (Jbilo et al., 2005). Ceci peut sembler anecdotique, mais l'antagoniste/agoniste inverse SR141716A (nom générique : Rimonabant, nom commercial : Accomplia) qui bloque l'activité de CB1 est actuellement sur le point d'être mis sur le marché par Sanofi-Aventis. La première indication est le traitement de l'obésité et le Rimonabant constituera le premier médicament à cibler spécifiquement le récepteur CB1 (exceptions faites des utilisations médicales du cannabis et de ses dérivés). Les essais cliniques sont achevés et les résultats publiés sont prometteurs (Van Gaal et al., 2005).

4.8 Activité constitutive du récepteur CB1

Le SR141716A, avant de devenir un coupe-faim miracle, a été le premier antagoniste du récepteur CB1 caractérisé. Il a été synthétisé par l'équipe de Gérard Le Fur chez Sanofi Recherche (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Les études montrèrent que le SR141716A pouvait non seulement bloquer l'action des agonistes cannabinoïdes, mais également posséder des effets propres opposés à ceux des agonistes dans des tests comportementaux (Santucci et al., 1996) ou dans des mesures de libération de neurotransmetteurs (Gatley et al., 1996). Cette propension à une activité que j'appellerai « cannabinoïde inverse » semblait indiquer la présence d'une activité basale du récepteur CB1. Cette activité basale peut être causée par la présence constante d'agonistes endogènes, et dans ce cas le SR141716A est un antagoniste neutre de l'action de ces agonistes. Alternativement, l'activité cannabinoïde inverse du SR141716A peut être une réversion de l'activité constitutive du récepteur CB1 (c'est-à-dire sa capacité à adopter une conformation active même en absence de ligand). Dans ce cas le SR141716A a un rôle réel d'agoniste inverse (Pertwee, 2005) (**Figure 5**). Depuis ces premières études, de nombreux cas d'effets cannabinoïde inverse ont été rapportés pour le SR141716A ou pour deux autres antagonistes/agonistes inverses analogues, les AM251 et AM281. On peut répartir ces effets selon le type d'expériences menées (**Figure 17**):

4.8.1 Effets cannabinoïde inverse *in vivo*

Ces expériences ont été réalisées par injection d'antagoniste/agoniste inverse chez le rat ou la souris. Citons les effets sur l'activité locomotrice (Bass et al., 2002), sur la mémoire ou la nociception (Rubino et al., 2000, **Figure 17A**). En absence de contrôle par un antagoniste neutre validé, il est difficile d'assigner la source de l'activité cannabinoïde inverse à des agonistes endogènes ou à l'activité constitutive de CB1.

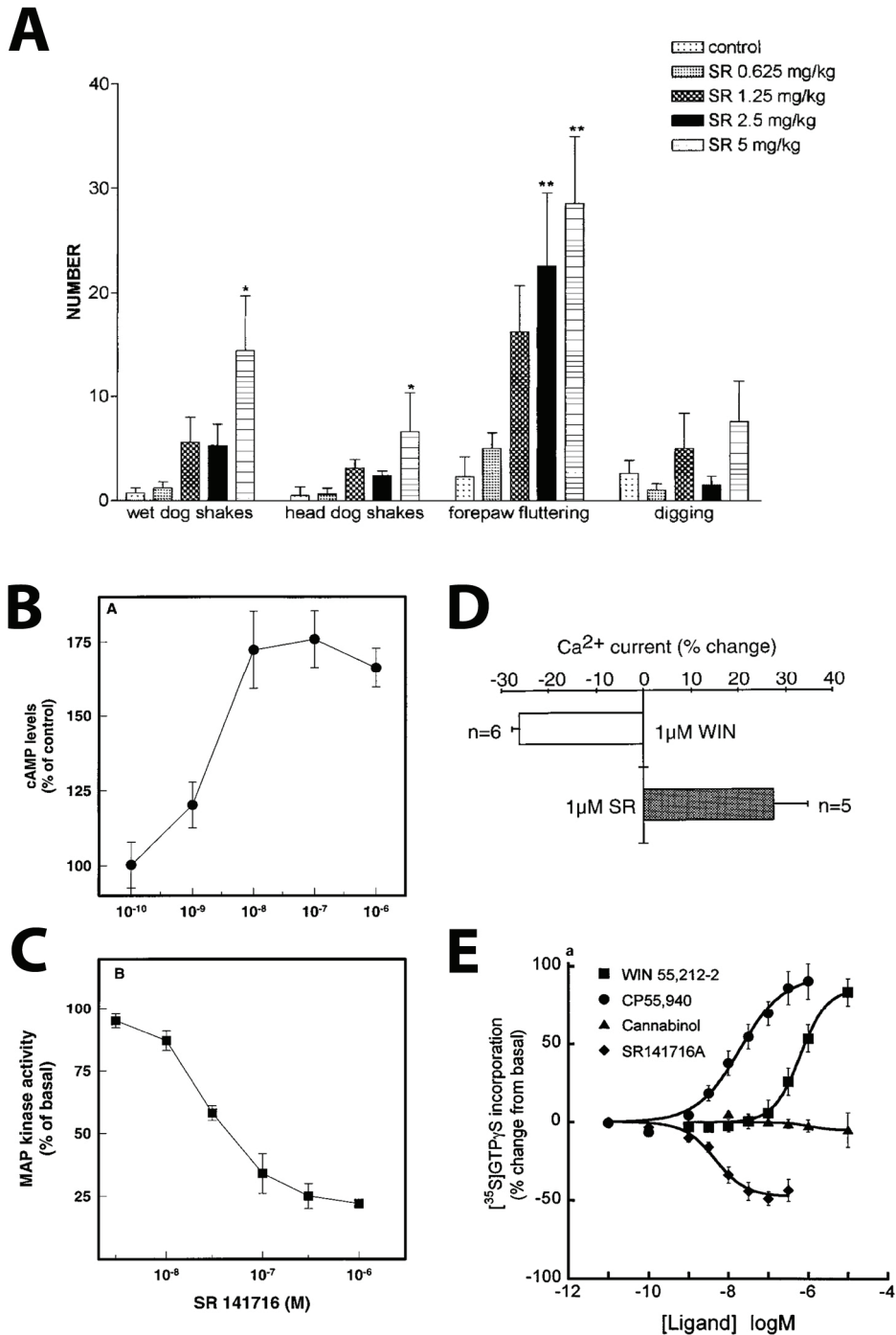


Figure 17 : Observations de l'effet cannabinoïde inverse

A/ Effet cannabinoïde inverse *in vivo* : l'injection de l'antagoniste/agoniste inverse SR141716A augmente certains comportements chez la souris comme les tremblements (*wet dog shake*) ou le creusement (*digging*). Tiré de Rubino et al., 2000.

B/ et C/ Effet cannabinoïde inverse du SR141716A sur la production d'AMPC (augmentation) et sur l'activité des MAP kinases (inhibition) pour des récepteurs CB1 exprimés dans des cellules CHO. D'après Rinaldi-Carmona et al., 1998.

D/ Effet cannabinoïde inverse du SR141716A sur des cultures de neurones du SCG microinjectées avec l'ADNc codant pour le récepteur CB1. D'après Pan et al., 1998.

E/ Effet agoniste inverse du SR141716A sur la liaison du [³⁵S]GTPγS dans des préparations de membranes de cerveau de rat. D'après MacLennan et al., 1998.

4.8.2 Effets cannabinoïde inverse *ex vivo*

Ceci comprend les mesures de libération de neurotransmetteurs. Alors que les agonistes inhibent généralement cette libération, les antagonistes/agonistes inverses stimulent la libération de neurotransmetteurs (Schlicker and Kathmann, 2001). Dans cette catégorie on trouve également l'inhibition de la DSI dans les tranches de cerveau par l'AM281 ou l'AM251 (Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson and Nicoll, 2001).

4.8.3 Effets cannabinoïde inverse *in vitro*

Dans cette catégorie, on trouve les tests portant sur l'activation des voies de signalisation. Les antagonistes/agonistes inverses peuvent provoquer une stimulation de la production d'AMPC (**Figure 17B**), une inhibition des MAPK (**Figure 17C**), une activation des courants calciques (**Figure 17D**). Ces données ont été recueillies pour des récepteurs CB1 exprimés de manière hétérologue dans des lignées cellulaires ou dans des cellules en culture exprimant le récepteur CB1 endogène comme les neurones du DRG (*Dorsal Root Ganglion*) ou les cellules granulaires du cervelet. Enfin, on trouve aussi les données de liaison du $^{35}\text{[S]GTP}\gamma\text{S}$ dans des préparations de membrane, montrant une inhibition de la liaison en présence d'antagoniste/agoniste inverse (**Figure 17E**) (Landsman et al., 1997; MacLennan et al., 1998).

4.8.4 Agonistes endogènes ou activité constitutive ?

Parmi ces données, il est souvent délicat d'évaluer la part d'effet cannabinoïde inverse due à l'antagonisme d'agonistes endogènes et la part d'effet due à l'inhibition de l'activité constitutive du récepteur, et ces possibilités sont rarement discriminées expérimentalement. Il est néanmoins clair que dans certaines études, l'effet de l'antagoniste/agoniste inverse provient des agonistes endogènes, par exemple dans le modèle des cultures de cellules granulaires du cervelet (Breivogel et al., 2004). Dans cette étude, l'AM281 diminue la liaison du $^{35}\text{[S]GTP}\gamma\text{S}$ sur les cellules perméabilisées (préparation contenant des endocannabinoïdes) mais n'a pas d'effet sur la liaison du $^{35}\text{[S]GTP}\gamma\text{S}$ sur des membranes préparées à partir de ces cultures (préparation dénuée d'endocannabinoïdes). Au-delà de ce rôle des agonistes endogènes dans l'activité basale du récepteur CB1, l'existence d'effets des antagonistes/agonistes inverses indépendants du récepteur CB1 a été évoquée pour réfuter l'activité constitutive de CB1 (Savinainen et al., 2003).

Cependant, nombre d'études ont clairement montré l'existence d'une activité constitutive intrinsèque au récepteur. Dans le cadre de préparations de membranes, la présence d'agonistes endogènes est exclue. Ce type d'expérience permet de démontrer l'activité constitutive du récepteur

CB1 et d'assigner sans ambiguïté un rôle d'agoniste inverse pour le SR141716A (Landsman et al., 1997). Citons également l'effet de l'AM251 sur la libération d'acétylcholine par les synaptosomes, préparation dénuée d'endocannabinoïdes, comme preuve formelle de l'activité agoniste inverse de ce composé (Gifford et al., 2000). L'existence d'effets cannabinoïdes inverses dans des cellules exprimant CB1 de manière hétérologue, et qui ne possèdent *a priori* pas la machinerie nécessaire à la synthèse d'endocannabinoïdes est également un indication forte d'un effet agoniste inverse sur le récepteur constitutivement actif : effets du SR141716A sur l'activité MAPK dans les cellules CHO (Bouaboula et al., 1997), sur les courants potassiques dans les oocytes de xénope (McAllister et al., 1999) ou effet de l'AM281 sur les courants calciques et potassiques dans les cellules HEK-293 (Vasquez et al., 2003). L'équipe de Deborah Lewis (Pan et al., 1998) a démontré l'activité constitutive de récepteurs CB1 exprimés dans des cultures de neurones sympathiques du ganglion pelvien majeur de rat (SCG) en mesurant l'inhibition des courants calciques (voir **Figure 17D**). Dans cette étude, l'effet d'agonistes endogènes a été exclu en utilisant des conditions de perfusion continue (qui lave les ligands éventuellement produits), ou un milieu sans calcium (qui empêche la production d'endocannabinoïdes), et en vérifiant qu'une addition d'AEA exogène ne modifiait pas l'effet du SR141716A. Ces résultats sont confirmés dans une autre étude, qui démontre l'inhibition des courants calciques par le SR141716A dans les neurones du DRG de rat exprimant le récepteur CB1 de façon endogène (Ross et al., 2001).

4.9 Interactions moléculaires et trafic intracellulaire du récepteur CB1

4.9.1 Activation et couplage aux protéines G

En aval de ses propriétés pharmacologiques d'activation, le couplage aux protéines G, la désensibilisation et l'internalisation du récepteur CB1 ont été étudiées au niveau moléculaire grâce à des systèmes d'expression hétérologues et des mutants du récepteur CB1. Tout d'abord, la queue carboxyterminale du récepteur CB1 est responsable de l'interaction avec les protéines $G_{i/o}$: la partie proximale (acides aminés 401 à 417) a un rôle activateur (Howlett et al., 1998), tandis que la partie distale (417 à 473) semble inhiber l'interaction avec les protéines G et réguler ainsi l'activité constitutive du récepteur CB1 (Nie and Lewis, 2001b, 2001a). L'interaction avec la protéine G_s , quant à elle, semble médiée par la troisième boucle intracellulaire (Abadji et al., 1999). De manière intéressante, les expériences réalisées sur l'activation d'autres récepteurs dans des cellules transfectées avec le récepteur CB1 montrent que le récepteur peut exister sous une forme inactive précouplée à la protéine $G_{i/o}$, séquestrant cette dernière et l'empêchant de jouer son rôle dans la signalisation des autres récepteurs présents (Bouaboula et al., 1997; Vasquez and Lewis, 1999).

Après l'activation du récepteur CB1, une désensibilisation par le biais de GRK2 et de la β -arrestine 2 est possible comme le montre le comportement de systèmes [récepteurs+GRK+ β -arr2] reconstruits dans l'oocyte de xénope (Jin et al., 1999). Cette désensibilisation fait intervenir les phosphorylations de sérines aux positions 426 et 439 de la queue carboxyterminale. Les relations entre l'activation des protéines G, la désensibilisation et l'internalisation sont assez floues, comme cela a été montré par le comportement des récepteur CB1 muté au niveau d'un résidu aspartate hautement conservé dans les RCPG, situé dans la deuxième hélice transmembranaire (D164 pour le CB1 de rat et D163 pour le CB1 humain). Certains auteurs ont montré que cette mutation provoque un découplage des protéines $G_{i/o}$ et une forte baisse de l'affinité du WIN pour le récepteur CB1 humain exprimé dans les cellules HEK-293 (Tao and Abood, 1998), tandis que le mutant correspondant chez le rat exprimé dans les cellules AtT20 garde son affinité pour les ligands, est découplé seulement des canaux potassiques mais pas des protéines G, et est incapable d'être internalisé (Roche et al., 1999). Une troisième étude montre que cette mutation empêche l'activité constitutive du récepteur CB1 mais pas son activation par les agonistes dans les neurones du SCG (Nie and Lewis, 2001b). Ces résultats montrent que les études des mutants ponctuels doivent être évaluées avec soin, les effets obtenus pouvant dépendre de l'espèce d'origine et du type cellulaire où est réalisée l'expression.

4.9.2 Endocytose du récepteur CB1

Le trafic du récepteur CB1 entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux a été étudié avant tout par immunocytochimie. En effet, les ligands étant très hydrophobes, ils sont perméants (ils pénètrent dans les cellules en traversant la bicouche phospholipidique). Ils ne permettent donc pas de réaliser des expériences de *binding* pour mesurer la quantité de récepteurs à la surface des cellules, même si certains auteurs s'y sont risqués (Keren and Sarne, 2003). Dans les cellules AtT20, le récepteur CB1 est internalisé quelques minutes après liaison d'agonistes comme le WIN, mais pas par le Δ^9 -THC (**Figure 18A**). Cette endocytose est inhibée par le sucrose hypertonique, indiquant plutôt une voie dépendante de la clathrine (Heuser and Anderson, 1989). Après une exposition courte à l'agoniste, le récepteur CB1 est recyclé efficacement à la membrane plasmique (Hsieh et al., 1999). Une autre étude a révélé que l'endocytose du récepteur CB1 est induite par un agoniste, mais que le traitement par un agoniste inverse augmente la densité de récepteurs CB1 à la membrane plasmique par translocation des récepteurs intracellulaires, un phénomène appelé « externalisation » (Rinaldi-Carmona et al., 1998). Dans cette étude, les traitements appliqués entre trente minutes et soixante-douze heures ne modifient pas la quantité totale de récepteurs CB1 présents dans la cellule, mais sont capable de déplacer les récepteurs vers

les compartiments intracellulaires (endocytose stimulée par un agoniste) ou de faire émerger les récepteurs intracellulaires à la surface de la cellule (externalisation par un agoniste inverse). Enfin, l'endocytose du récepteur CB1 endogène par un agoniste a été étudiée dans les neurones d'hippocampe en culture, montrant une disparition plus lente (quelques heures) des récepteurs exprimés à la surface des axones (Coutts et al., 2001) (**Figure 18B**).

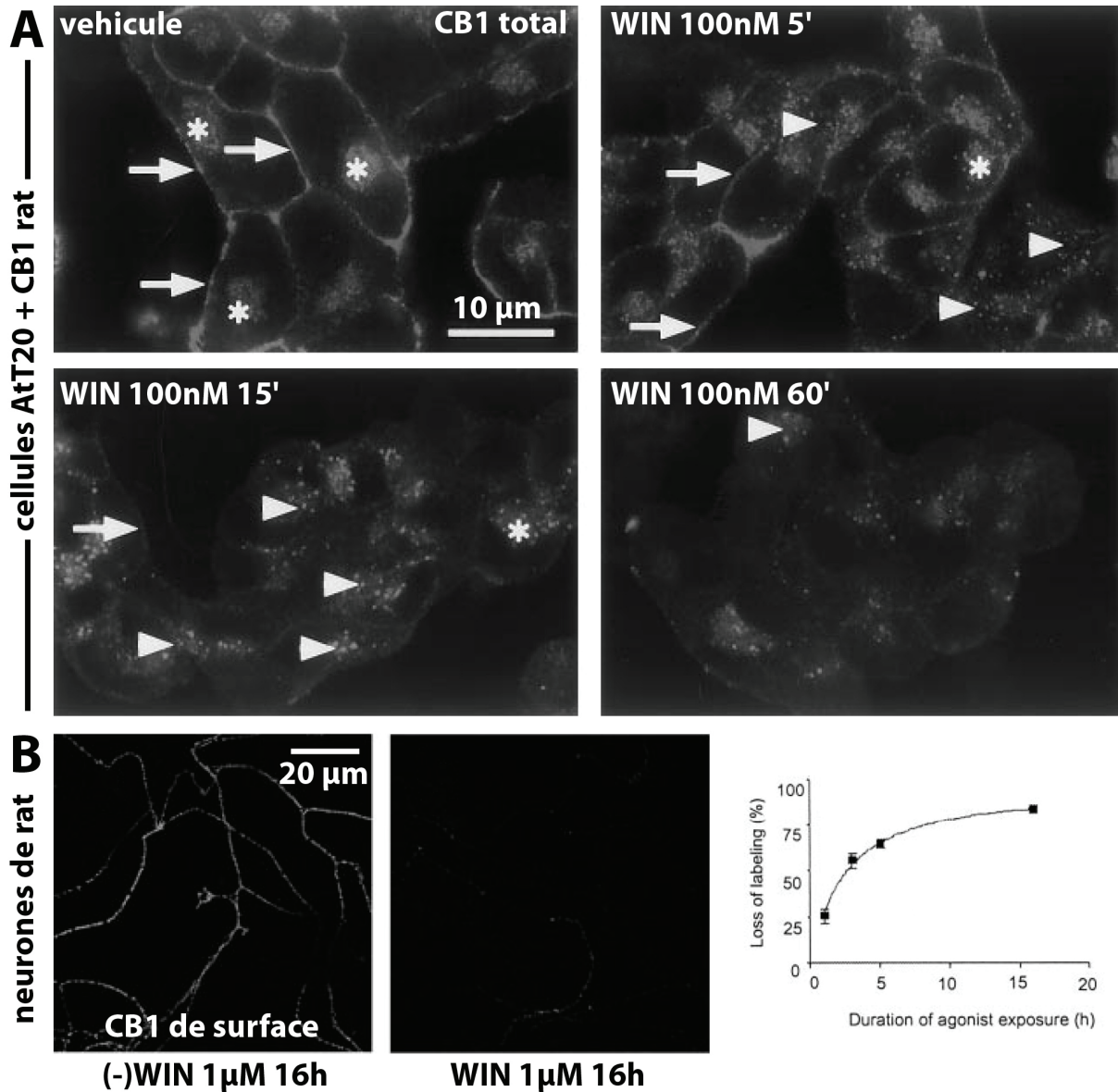


Figure 18 : Endocytose du récepteur CB1

A/ Endocytose du récepteur CB1 exprimé dans des cellules AtT-20 fixées et marquées pour CB1 après perméabilisation. L'agoniste WIN provoque une internalisation rapide et complète après 15 à 30 minutes. D'après Hsieh et al., 1999.

B/ Endocytose du récepteur CB1 endogène dans des cultures de neurones d'hippocampe de rat. Seuls les récepteurs de surface sont marqués par une incubation de l'anticorps à épitope extracellulaire avant perméabilisation. Les récepteurs à la surface des axones disparaissent lentement, avec une endocytose totale seulement après 16 h (graphe cinétique à droite). Tiré de Coutts et al., 2001.

De nombreuses lacunes subsistaient néanmoins concernant le trafic intracellulaire du récepteur CB1 lorsque nous avons commencé ce travail. Notamment, la relation entre l'activité constitutive avérée du récepteur et son endocytose était inconnue : y a-t-il endocytose constitutive, comme le suggéraient les expériences de Rinaldi-Carmona et collaborateurs (Rinaldi-Carmona et al., 1998) ainsi que la description de récepteurs intracellulaires *in vitro* et *in vivo* ? Quelle est la raison de la différence de cinétique d'endocytose observée dans les cellules AtT20 (trente minutes, Hsieh et al., 1999) et à la surface des axones de neurones en culture (seize heures, Coutts et al., 2001) ? Nous avons donc décidé d'étudier le trafic intracellulaire du récepteur CB1, en examinant en particulier le rôle de l'activité constitutive dans ce trafic, dans les cellules en culture et dans les neurones.

RÉSULTATS

1 Trafic intracellulaire du récepteur CB1

1.1 Introduction : trafic des récepteurs constitutivement actifs

Comme on l'a vu, l'activité constitutive des RCPG est une propriété pharmacologique partagée par de nombreux récepteurs. Cependant, au départ de notre travail, les conséquences de l'activité constitutive en termes de désensibilisation et de trafic intracellulaire étaient assez peu connues. Une classe de récepteurs, mutants ou sauvages, avait été caractérisée : ces récepteurs présentaient une sensibilité réduite à l'activation par leurs agonistes, ainsi qu'une accumulation intracellulaire de récepteurs. Pour certains de ces récepteurs, il avait été observé que le traitement par un antagoniste/agoniste inverse modifiait cette localisation subcellulaire ainsi que la quantité totale de récepteurs présents dans la cellule. Quatre lignes de recherches avaient étudié la régulation de ces récepteurs : récepteurs retenus dans le réticulum endoplasmique, avec un rôle chaperon pour les antagonistes, récepteurs constitutivement désensibilisés à la membrane plasmique, récepteurs constitutivement actifs à la surface cellulaire, amenant leur endocytose suivie de leur dégradation accélérée, et enfin récepteurs présentant un cycle constitutif d'endocytose et de recyclage, cycle similaire au cas d'un récepteur activé par un agoniste mais déclenché en absence de ligand par l'activité constitutive.

1.1.1 Récepteurs retenus dans le RE

Le diabète insipide néphrologique (DIN) est une maladie génétique rare, transmise au garçon par la mère, provoquant une incapacité des reins à concentrer les urines. En 1992, l'implication d'une forme mutée du récepteur à la vasopressine V₂, récemment cloné et présent sur le bras long du chromosome X chez l'homme (Birnbaumer et al., 1992), a été démontrée (Rosenthal et al., 1992). Depuis, plus de 150 mutations de ce RCPG ont été caractérisées, causant le DIN. L'équipe de Michel Bouvier à Montréal a démontré que certains de ces mutants, notamment celui comportant une délétion de trois acides aminés V₂(Δ 62-64), sont mal repliés et retenus dans le réticulum endoplasmique (RE) par la machinerie de vérification des protéines néosynthétisées. La

majorité des récepteurs V2(Δ 62-64) n'achèvent pas leur maturation et sont envoyés vers les voies de dégradation, une faible proportion seulement atteignant la membrane plasmique. L'application d'un antagoniste non peptidique perméant du récepteur V2R, le SR121463A, a une action de chaperon et promeut le repliement correct du récepteur, provoquant une augmentation de la population membranaire (Morello et al., 2000). Ce premier modèle ne prend pas en compte une éventuelle activité constitutive des récepteurs, mais explique l'accumulation intracellulaire ainsi que l'externalisation par des antagonistes. Ce mécanisme a été par la suite impliqué dans le trafic de certains récepteurs sauvages comme les récepteur δ opioïde (Petaja-Repo et al., 2002) et le récepteur à l'hormone lutéinisante LHR (Pietila et al., 2005).

1.1.2 Désensibilisation constitutive

Une autre mutation, au niveau du motif DRY du récepteur de la vasopressine, V2(R127H), est présente dans certains cas de DNI. L'équipe de Marc Caron a montré que ce récepteur muté ne possédait pas d'activité de signalisation : il atteint bien la membrane plasmique, mais il est rapidement et constitutivement désensibilisé dès son apparition à la surface (Barak et al., 2001). V2(R127H) recrute constitutivement la β -arrestine, ce qui provoque son endocytose constitutive et diminue la population membranaire du récepteur d'un facteur dix. La majorité des récepteurs est ainsi localisée dans les compartiments endosomaux. Ces résultats ont depuis été étendus à d'autres récepteurs grâce à des mutants du récepteur α_1 adrénergique et du récepteur de l'angiotensine II AT_{1A} (Wilbanks et al., 2002). Il faut noter que les mutants considérés dans ces études ne sont pas constitutivement actifs, car le couplage avec les protéines G est empêché par la désensibilisation constitutive. De plus, en liaison avec le mécanisme précédent de promotion du repliement par des antagonistes chaperons, le récepteur mutant V2(R127H) présente également une rétention dans le RE qui est surmontable par l'application de l'antagoniste SR49059 (Bernier et al., 2004).

1.1.3 Déstabilisation de récepteurs constitutivement actifs

Les deux types de régulations suivantes font intervenir l'activité constitutive du récepteur, et ont été découvertes grâce à des mutants de RCPG présentant une activité constitutive importante, généralement absente chez le récepteur sauvage correspondant. De tels mutants sont appelés CAM (*Constitutively Activated Mutants*). Un CAM du récepteur β_2 adrénergique (β_2 AR) est obtenu en remplaçant un segment de la troisième boucle intracellulaire par la région correspondante du récepteur α_1 adrénergique (Samama et al., 1993). Graeme Milligan et ses collaborateurs ont observé que ce mutant CAM- β_2 AR est uprégulé par un traitement avec des agonistes inverses du β_2 AR

(MacEwan and Milligan, 1996). Ces traitements prolongés de 24h entraînent une augmentation de la quantité totale de récepteurs, particulièrement visible à la membrane plasmique, ce qui augmente les capacités de liaison des cellules (**Figure 19A**). En microscopie, les auteurs observent une localisation majoritairement intracellulaire du CAM- β_2 AR en absence de ligand, et déduisent que les récepteurs sont rapidement retirés de la membrane plasmique et dégradés (McLean et al., 1999). Les agonistes inverses stabilisent le récepteur à la membrane plasmique et ralentissent sa dégradation, provoquant une uprégulation progressive de la quantité de récepteurs (Milligan et al., 2002). Notons que dans ces études l'accent est porté sur des régulations à long terme (vingt-quatre heures) du nombre total de récepteurs, plutôt que sur les phénomènes de trafic et de translocations qui pourraient intervenir à des échelles de temps plus petites. La stabilisation de récepteurs constitutivement actifs par les agonistes inverses a également été mise en évidence pour un CAM du récepteur α_1 adrénergique (Lee et al., 1997) et β_1 adrénergique (McLean et al., 2002), pour un CAM du récepteur opioïde μ MOR(D164Q) (Li et al., 2001) et pour le récepteur à l'histamine H2 (Osawa et al., 2005). Certaines études ont montré que cet effet de stabilisation n'était pas forcément lié au caractère inactivateur de l'agoniste inverse car pour certains récepteurs, l'uprégulation peut intervenir quelle que soit la nature du ligand, agoniste ou agoniste inverse (Gether et al., 1997; Alewijnse et al., 2000).

1.1.4 Translocation des récepteurs constitutivement actifs

Les études de l'équipe de Gérard LeFur chez Sanofi Recherche concernant la localisation et le trafic des récepteurs CB1 et CB2 ont été les premières à suggérer le lien entre activité constitutive et endocytose constitutive, en décrivant l'effet des agonistes inverses sur la localisation subcellulaire des récepteurs. Le récepteur CB1 est uprégulé à la surface, sans variation du nombre total de récepteurs, après traitement court (30 minutes) par l'agoniste inverse SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1998). Les auteurs suggèrent que le récepteur est constitutivement internalisé du fait de son activité constitutive, et que l'agoniste inverse bloque cette endocytose constitutive, provoquant une translocation des récepteurs à la membrane plasmique. Cet effet est nommé externalisation, par opposition à l'internalisation provoquée par l'agoniste. Des résultats similaires sont obtenus avec le récepteur CB2, qui est transporté à la membrane plasmique en présence de l'agoniste inverse SR144528 (Bouaboula et al., 1999a). Les études du groupe d'Eric Clauser ont mis en évidence l'externalisation de récepteur à l'angiotensine CAM par des agonistes inverses : les CAM du récepteur AT_{1A} obtenus par Charles Parnot (Parnot et al., 2000), notamment AT_{1A} (L305Q), sont constitutivement internalisés (Miserey-Lenkei et al., 2001), et sont externalisés

par l'agoniste inverse losartan appliqué pendant une à deux heures (Miserey-Lenkei et al., 2002) (Figure 19B).

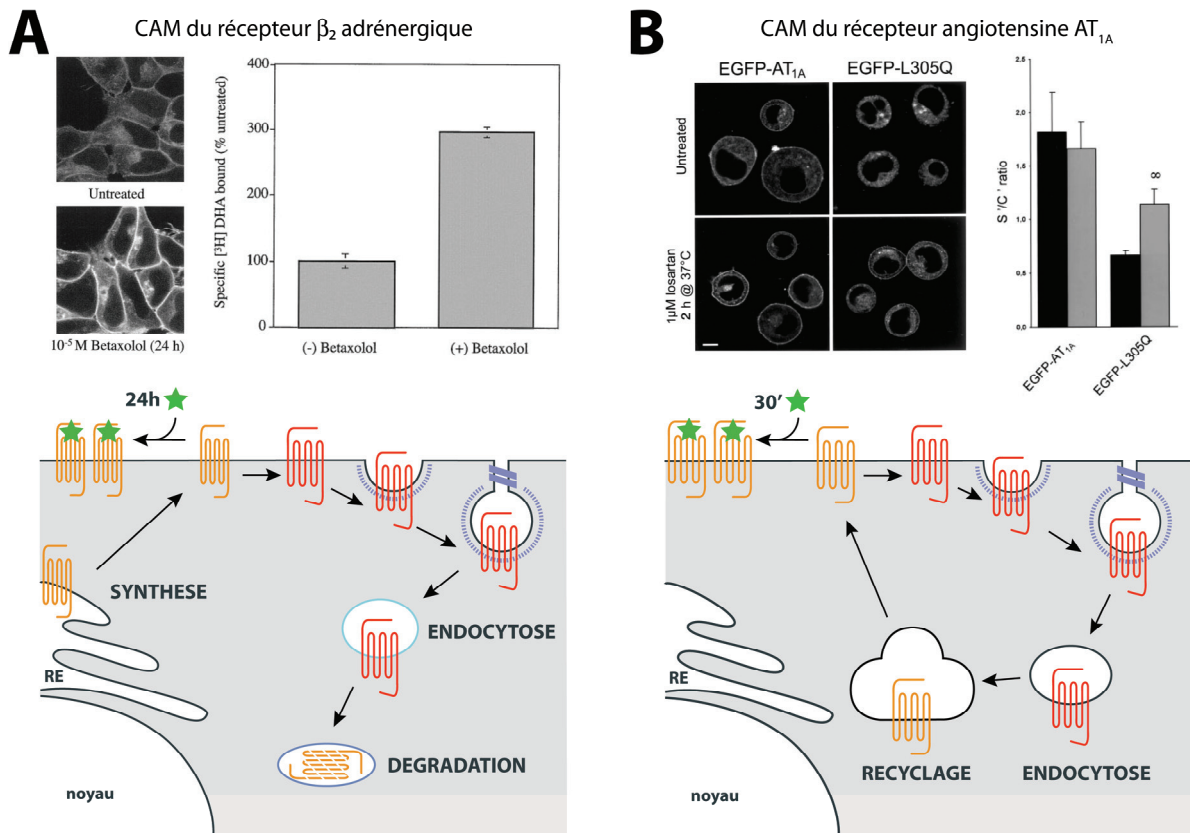


Figure 19 : Modèles de la régulation des récepteurs CAM par un agoniste inverse

A/ Modèle de déstabilisation. Le récepteur constitutivement actif, ici un mutant (*Constitutively Activated Mutant* CAM) du récepteur β_2 adrénergique, est spontanément internalisé et dégradé avec une vitesse de *turnover* plus rapide que le récepteur sauvage. L'agoniste inverse appliqué à long terme (betaxolol pendant 24h) stabilise le récepteur en conformation inactive et augmente la quantité de récepteurs à la membrane plasmique au fur et à mesure de la biosynthèse, provoquant également une uprégulation de la quantité totale de récepteurs. D'après McLean et al., 1999.

B/ Modèle de cycle constitutif. Le mutant AT_{1A}-L305Q est constitutivement internalisé et recyclé, ce qui conduit à une distribution majoritairement intracellulaire à l'équilibre. L'agoniste inverse losartan appliqué à court terme (2h) est capable d'externaliser le récepteur, en bloquant l'endocytose constitutive. Cette translocation ne change pas la quantité totale de récepteurs dans la cellule. D'après Miserey-Lenkei et al., 2002.

1.1.5 Questions posées

Le trafic intracellulaire des récepteurs constitutivement actifs était donc, au début de ma thèse, un domaine assez neuf. Partant des résultats de Stéphanie Miserey-Lenkei obtenus sur les CAM du récepteur de l'angiotensine AT_{1A}, nous avons voulu examiner en détail les conséquences de l'activité constitutive avérée du récepteur CB1, en ligne avec les résultats pionniers de Rinaldi-Carmona et al (Rinaldi-Carmona et al., 1998), qui ne démontrent pas directement l'endocytose

constitutive et n'abordent pas la nécessité d'un mécanisme de recyclage pour alimenter la translocation induite par l'agoniste inverse. En ligne avec cette hypothèse d'endocytose constitutive, nous avons à l'esprit plusieurs travaux montrant la prévalence de la population intracellulaire du récepteur CB1 : *in vitro*, le récepteur est majoritairement intracellulaire dans les cellules N18TG2 (McIntosh et al., 1998), tandis qu'*in vivo* les effets des agonistes sont maximum pour un taux d'occupation de 7,5 % des récepteurs CB1, indiquant la présence d'une réserve intracellulaire importante (Gifford et al., 1999). La question posée était la suivante : l'activité constitutive du récepteur CB1 sauvage est-elle responsable de son endocytose constitutive et d'un cycle d'endocytose/recyclage, comme cela a été montré pour des récepteurs mutés de l'angiotensine ?

Zsolt Lenkei, au sein du laboratoire de Pierre Corvol au Collège de France, avait mis au point des méthodes nouvelles d'évaluation et de quantification de la localisation subcellulaire de récepteurs fusionnés à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Lenkei et al., 2000). Cette méthode, appelée *Single Cell Optical Pharmacology* (SCOP), constituait une approche novatrice et performante des relations entre la pharmacologie et le trafic intracellulaire du récepteur CB1. Nous avons fabriqué une protéine fusion CB1-eGFP composée du récepteur CB1 de rat et de l'*enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), insérée au bout de la queue carboxyterminale intracellulaire du récepteur. L'autre outil important pour quantifier la distribution des récepteurs entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux est un anticorps dirigé contre une partie de la queue aminoterminal du récepteur (anticorps N-Ter), permettant un marquage des récepteurs en surface sur les cellules vivantes. Nous avons exprimé le récepteur CB1-eGFP dans une lignée de cellules humaines HEK-293 et la distribution subcellulaire du récepteur a été évaluée et quantifiée. Les variations de cette distribution après traitement par des agonistes et agonistes inverses du récepteur ont été mesurées.

Nous avons démontré dans ce travail que l'activité constitutive de CB1 provoque un cycle constitutif d'endocytose et de recyclage. Ce cycle a pour conséquence une localisation majoritairement intracellulaire à l'équilibre en condition contrôle. Si l'on traite les cellules avec l'agoniste inverse, la diminution de l'activité basale induit une inhibition de l'endocytose constitutive, et les récepteurs s'accumulent progressivement à la membrane plasmique au fur et à mesure du recyclage des récepteurs présents dans les compartiments intracellulaires. L'inhibition de l'endocytose cellulaire provoque une translocation similaire du récepteur à la membrane plasmique, tandis que l'inhibition du recyclage bloque l'effet de l'agoniste inverse. Au niveau moléculaire, le récepteur est internalisé par une voie dépendante de Rab5 et recycle avec une cinétique lente par une voie qui dépend de Rab4, mais pas de Rab11. Nous exposerons les méthodes clés mises en

place pour réaliser ce travail, puis les résultats seront résumés. L'article original sera présenté, discuté et mis en perspective, en insistant sur les éléments nouveaux apportés par ce travail et les généralisations possibles du modèle proposé.

1.1.6 Méthodes : la *Single Cell Optical Pharmacology* (SCOP)

Notre travail se place à l'interface entre la pharmacologie et la biologie cellulaire. En effet, nous avons tenté d'approcher une problématique pharmacologique (la régulation des RCPG possédant une activité constitutive) avec les outils de la biologie cellulaire, notamment l'utilisation de protéines chimères de la GFP et l'imagerie optique à haute résolution. L'utilisation de la GFP comme marqueur de localisation par le biais de fusion avec des protéines d'intérêt a été développée au début des années 1990 (Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994), puis rapidement appliquée à l'étude du trafic des RCPG avec comme premiers exemples le récepteur β_2 adrénergique (Barak et al., 1997) et le récepteur à la cholecystokinine type A (Tarasova et al., 1997). Depuis, l'utilisation de la GFP pour l'étude de la localisation et du trafic de RCPG s'est généralisée (Milligan, 1999; Kallal and Benovic, 2000; Daly and McGrath, 2003). Dans ces études, la visualisation que permet l'étiquetage par la GFP est souvent utilisée comme complément qualitatif de mesures biochimiques de la densité de récepteurs membranaires que sont le *binding* ou la biotinylation de surface. Ces méthodes biochimiques mesurent les phénomènes de manière macroscopique et ne peuvent résoudre la distribution du récepteur à l'échelle de la cellule unique. L'idée de la pharmacologie optique sur cellule unique (*Single Cell Optical Pharmacology* ou SCOP) est d'utiliser l'imagerie confocale de cellules exprimant le récepteur étiqueté par la GFP pour obtenir une information quantitative sur la distribution subcellulaire du récepteur à l'échelle de la cellule unique. Cette méthode a d'abord été appliquée à la détection de l'internalisation du récepteur à la neurotensine NT1 (Lenkei et al., 2000), puis au trafic intracellulaire du récepteur à l'angiotensine II AT_{1A} et de plusieurs de ses mutants (Miserey-Lenkei et al., 2002) : nous l'avons à notre tour appliquée à l'étude de la localisation du récepteur CB1.

Le récepteur étiqueté par la GFP est transfecté de manière transitoire dans des cellules HEK-293. Un ou deux jours après la transfection, les cellules sont redéposées, adhèrent pendant une heure sur un substrat de verre traité à la polyallylamine, puis sont traitées (trente minutes à trois heures) par des agonistes ou agonistes inverses du récepteur et fixées. La distribution du récepteur est évaluée par microscopie confocale : on réalise une coupe optique du plan médian de la cellule, qui est encore approximativement sphérique quelques heures après l'ensemencement. Cette forme simple permet de définir facilement la localisation de la membrane plasmique et de quantifier les récepteurs en surface par rapport aux récepteurs intracellulaires. Ceci est réalisé par un algorithme

qui mesure la densité de fluorescence et l'intensité totale des populations de récepteurs à la membrane plasmique et dans le cytoplasme, corrigé par une mesure du bruit de fond au niveau du noyau. Le rapport des populations membranaire et intracellulaire, appelé rapport de fluorescence membranaire (*Membrane Fluorescence Ratio* ou MFR), est utilisé comme quantification de la distribution du récepteur. Nous avons réalisé plusieurs contrôles pour vérifier la pertinence de cette mesure. Tout d'abord, nous avons comparé les distributions du récepteur étiqueté par la GFP (CB1-eGFP) et du récepteur sauvage (CB1-WT), ainsi que l'effet de l'expression de CB1-eGFP ou CB1-WT sur l'accumulation d'AMPC stimulée par la forskoline. De plus, nous avons vérifié les valeurs du MFR déduites de la distribution du récepteur étiqueté grâce à une deuxième méthode de quantification. L'étiquetage des récepteurs de surface avec l'anticorps à épitope extracellulaire N-Ter révélé en rouge permet de mesurer le rapport des fluorescences Rouge/Vert (Total des récepteurs/Récepteurs en surface), et ce rapport est corrélé aux valeurs du MFR. Enfin, nous avons vérifié que le taux d'expression du récepteur dans une cellule donnée (fluorescence GFP totale) n'est pas corrélé à la valeur du MFR pour cette cellule, excluant un biais dû à la surexpression du récepteur dans les cellules HEK-293.

1.2 Résultats

1.2.1 Distribution et dynamique de CB1-eGFP

Dans les HEK-293, le récepteur CB1-eGFP est majoritairement localisé dans des vésicules intracellulaires (85 %) et dans une moindre mesure à la membrane plasmique (15 %). Ce patron d'expression est conservé dans les cellules épithéliales polarisées *Lilly Pork Kidney Cells* (LLC-PK1) et dans les neuroblastomes SHSY-5Y (**Figure 1 de l'article 1**). Les vésicules ne colocalisent pas avec des marqueurs de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique ou des lysosomes, mais colocalisent partiellement avec la transferrine fluorescente (Tf) ou le récepteur à la transferrine endogène (TfR) (**Figure 2 de l'article 1**). L'imagerie des cellules vivantes exprimant CB1-eGFP montre une distribution similaire du récepteur CB1, avec une population intracellulaire présente dans des compartiments vésiculaires dynamiques et mobiles, pouvant fusionner ou se séparer de la membrane plasmique (**Figure 3 de l'article 1**). Toutes ces observations montrent qu'à l'équilibre, en condition contrôle, le récepteur CB1 est présent en grande quantité dans des compartiments possédant une morphologie endosomale et qu'un transport entre ces compartiments endosomaux et la membrane plasmique semble exister, d'après l'observation des cellules vivantes.

1.2.2 Translocations induites par les ligands de CB1

Nous avons ensuite traité les cellules pendant trois heures avec différents ligands du récepteur CB1 et observé la variation du rapport de fluorescence membranaire MFR. Les ligands agonistes qui activent le récepteurs, notamment le WIN à 330 nM, internalisent complètement la population membranaire minoritaire, provoquant une diminution marquée du MFR (**Figure 4 de l'article 1**). Cet effet est antagonisable par l'antagoniste/agoniste inverse AM281, mais l'AM281 a également un effet agoniste inverse : appliqué seul (9 μ M), il uprégule la population membranaire des récepteurs CB1 au détriment de la population endosomale, provoquant une augmentation du MFR. L'agoniste inverse provoque une translocation des récepteurs CB1 des endosomes vers la membrane plasmique, suggérant qu'un cycle continu d'endocytose et de recyclage du récepteur est à l'œuvre. Les courbe dose-réponse montrent que la distribution subcellulaire des récepteurs CB1 est sensible à des doses nanomolaires de ligands, ce qui montre la spécificité pharmacologique des effets observés. De plus, les cinétiques des effets sont différentes : pour l'agoniste WIN qui déclenche l'internalisation simultanée de tous les récepteurs CB1 en surface, la variation du MFR est exponentielle et l'internalisation complète après quelques minutes. Pour l'agoniste inverse AM281, l'uprégulation membranaire est progressive et complète après deux heures, ce qui suggère que l'agoniste inverse séquestre à la membrane les récepteurs CB1 progressivement apportés depuis les compartiments endosomaux par un recyclage lent.

1.2.3 Endocytose constitutive et rôle du recyclage

Pour vérifier la présence d'un cycle endocytique, nous avons réalisé une expérience dite d'*antibody feeding* : les cellules exprimant CB1-eGFP ont été incubées avec l'anticorps N-Ter pendant 2h. Après fixation et perméabilisation, l'anticorps révèle des récepteurs CB1 intracellulaires, montrant que ceux-ci ont été internalisés depuis la surface (**Figure 5 de l'article 1**). Ceci révèle l'internalisation constitutive du récepteur CB1. D'autre part, l'inhibition de l'endocytose cellulaire par l'utilisation de méthyl- β -cyclodextrine (Rodal Mol Biol Cell 1999, Subtil PNAS 1999) inhibe l'endocytose du récepteur CB1 et uprégule la population membranaire, imitant l'effet de l'agoniste inverse : l'implication de l'endocytose dans la distribution intracellulaire des récepteurs CB1 est donc démontrée. En ce qui concerne l'inhibition du recyclage, les inhibiteurs chimiques couramment utilisés pour interférer avec le recyclage endosomal sont divers : la monensine bloque l'acidification des compartiments endosomaux, la wortmannine et le LY294002 sont des inhibiteurs des PI3-Kinases, et la bréfeldine A (BFA) inhibe le transport dépendant de la GTPase Arf-1. Toutes ces substances, agissant à des degrés divers sur le recyclage

du récepteur CB1, peuvent bloquer l'externalisation induite par l'agoniste inverse AM281 (**Figure 5 de l'article 1**). L'implication du recyclage dans le mécanisme d'action de l'agoniste inverse est renforcée par ces résultats.

1.2.4 Rôle des protéines Rab dans le transport du récepteur CB1

Pour vérifier ces conclusions et compléter la description du cycle constitutif d'endocytose/recyclage de CB1, nous avons étudié le rôle des protéines Rab dans la localisation du récepteur CB1, en particulier Rab5 (présente sur les vésicules d'endocytose et les endosomes précoces), Rab4 (endosomes précoces et endosomes de recyclage) et Rab11 (endosomes de recyclage) (**Figure 6 de l'article 1**). Pour cela, nous avons cotransfecté le récepteur CB1 non étiqueté avec des plasmides codant pour les Rab sauvages ou mutantes fusionnées à la GFP : les mutants sont des dominants négatifs constitutivement liés au GDP, ou au contraire des Rab constitutivement actives par liaison permanente au GTP. Nous avons mesuré l'effet de la présence des Rab sauvages/inactives/actives sur la localisation de CB1 en absence de ligand (contrôle), son internalisation par l'agoniste WIN et son externalisation par l'agoniste inverse AM281. La détection du récepteur CB1 est réalisée après fixation et perméabilisation grâce à un anticorps contre la partie carboxyterminale du récepteur.

Les cotransfections ont été ajustées pour que la présence des Rab sauvages ne perturbe pas la distribution et les translocations du récepteur CB1, permettant d'évaluer les effets des Rab dominant négatif et constitutivement active. Rab5 est impliquée dans l'endocytose du récepteur, car Rab5(S34N) dominant négatif provoque une translocation des récepteurs vers la membrane plasmique et inhibe l'internalisation des récepteurs CB1 par l'agoniste WIN. Rab5(Q79L) constitutivement active séquestre le récepteur CB1 dans des compartiments intracellulaires et empêche l'externalisation réalisée par l'agoniste inverse. Les effets de Rab4 sont opposés à ceux de Rab5 : Rab4(S22N) dominant négatif augmente la population intracellulaire de récepteurs CB1 tandis que Rab4(Q67L) constitutivement active augmente la population membranaire. Ceci montre une implication de Rab4 dans le recyclage du récepteur CB1. Enfin, les mutants de Rab11 n'ont pas d'effet sur la localisation de CB1, ce qui laisse penser que cette protéine n'intervient pas dans le trafic intracellulaire du récepteur.

1.3 Article 1: "Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor"

Constitutive Endocytic Cycle of the CB1 Cannabinoid Receptor*[§]Received for publication, April 9, 2004, and in revised form, June 9, 2004
Published, JBC Papers in Press, June 21, 2004, DOI 10.1074/jbc.M403990200Christophe Leterrier[‡], Damien Bonnard[‡], Damien Carrel[§], Jean Rossier[‡], and Zsolt Lenkei^{‡¶}From [‡]ESPCI-CNRS UMR 7637, Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France and [§]INSERM U288, NeuroPsychoPharmacologie Moléculaire, Cellulaire et Fonctionnelle, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91 bd de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France

The CB1 cannabinoid receptor (CB1R) displays a significant level of ligand-independent (*i.e.* constitutive) activity, either when heterologously expressed in non-neuronal cells or in neurons where CB1Rs are endogenous. The present study investigates the consequences of constitutive activity on the intracellular trafficking of CB1R. When transfected in HEK-293 cells, CB1R is present at the plasma membrane, but a substantial proportion (~85%) of receptors is localized in intracellular vesicles. Detailed analysis of CB1-EGFP expressed in HEK-293 cells shows that the intracellular CB1R population is mostly of endocytic origin and that treatment with inverse agonist AM281 traps CB1R at the plasma membrane through a monensin-sensitive recycling pathway. Co-transfection with dominant positive or dominant negative mutants of the small GTPases Rab5 and Rab4, but not Rab11, profoundly modifies the steady-state and ligand-induced intracellular distribution of CB1R, indicating that constitutive endocytosis is Rab5-dependent, whereas constitutive recycling is mediated by Rab4. In conclusion, our results indicate that, due to its natural constitutive activity, CB1R permanently and constitutively cycles between plasma membrane and endosomes, leading to a predominantly intracellular localization at steady state.

G-protein-coupled receptors (GPCRs)¹ represent one of the largest protein superfamilies, with around 1000 receptors in vertebrates (1). The classical paradigm of GPCR function stipulates that GPCRs localize on the cell surface and are activated by the binding of agonist ligands. This leads to G-protein activation and initiates various changes in intracellular signaling pathways. After activation, most GPCRs are endocytosed from cell surface and travel to low pH endosomes, allowing the ligand to detach before the receptor is recycled back to the cell surface or sent through late endosomes to lysosomes for degradation (2). Increasing evidence shows also that some GPCRs are not totally inactive in the absence of ligands but exhibit

tonic (*i.e.* constitutive) activity, with elevated basal levels of intracellular signaling (3).

Pharmacological characterization of constitutively active GPCRs leads to the definition of three different ligand classes: agonists, neutral antagonists, and inverse agonists. In the two-state model of receptor activation (4), receptors are in equilibrium between a inactive and an active state. An agonist stabilizes the active state, shifting the receptor population toward activation, a neutral antagonist binds with equal affinity to both active and inactive conformation, whereas an inverse agonist will preferentially stabilize the inactive state. In the absence of ligand, the equilibrium for most GPCRs is shifted strongly to the inactive state, whereas for constitutively active receptors, the equilibrium is shifted toward the active state. Thus, by spontaneously adopting the active conformation, constitutively active GPCRs are able to mobilize cellular signaling pathways in the absence of agonist ligands, and inverse agonist ligands inhibit this basal activation.

The cannabinoid type I receptor (CB1R) is one of the most abundant GPCRs in the central nervous system, with a high level of expression in cortex, hippocampus, basal ganglia, and cerebellum (5). CB1Rs are coupled to G_{i/o}-proteins, and activation results in inhibition of cAMP accumulation; mitogen-activated protein kinase activation; inhibition of L, P, Q, and N type Ca²⁺ channels; and activation of Kir type K⁺ channels (6). Interestingly, the CB1R, like numerous other GPCRs, displays a high level of constitutive activity (3), either when heterologously expressed in nonneuronal cells (7) or in neurons where CB1Rs are endogenous (8, 9).

In contrast to pharmacology, few studies address the question of intracellular trafficking of constitutively active GPCRs (10, 11). Therefore, we studied the subcellular distribution of the CB1R as well as its trafficking in response to various pharmacological stimulations. We constructed a CB1-EGFP chimera, transiently expressed CB1-EGFP in HEK-293 cells and quantified the subcellular distribution and translocation after different pharmacological treatments. Our results indicate that the constitutively active CB1R undergoes constitutive endocytosis and recycling mediated by the small GTPases Rab5 and Rab4, respectively.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids, Antibodies, and Reagents—Antibody production was performed by Eurogentec (Herstal, Belgium). The C-Ter antibody was produced by injection of a peptide corresponding to the last 14 C-terminal residues (positions 459–473) of the rat CB1R coupled to keyhole limpet hemocyanin in rabbits followed by affinity purification of sera against the 459–473 peptide. The L14 antibody, kindly provided by Dr. Ken Mackie (University of Washington, Seattle, WA), is directed against the same epitope that is present both in the rat and the mouse receptor. The specificity of the L14 antibody was verified by Western

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s).

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains one movie.

[¶] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-40-79-51-84; Fax: 33-1-40-79-47-57; E-mail: zsolt.lenkei@espci.fr.

¹ The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; CB1R, CB1 cannabinoid receptor; GFP, green fluorescent protein; EGFP, enhanced GFP; MFR, membrane fluorescence ratio; Tf, transferrin; TfR, Tf receptor; WIN, WIN55,212-2; MβCD, methyl-β-cyclodextrin; ER, endoplasmic reticulum.

blotting and immunohistochemistry on CB1^{+/+} and CB1^{-/-} mice.² The N-Ter antibody was produced by Double-X program (Eurogentec) with coinjection of keyhole limpet hemocyanin peptides corresponding to residues 22–36 and 53–67 of the receptor in rabbits, followed by affinity purification of the sera against the 53–67 peptide. The anti-human transferrin receptor OKT9 antibody was from ATCC, and the Cy3-conjugated transferrin was a gift from Dr. Alice Dautry (Institut Pasteur, Paris, France). Anti-Golgi matrix 130 protein (GM130; Golgi marker) was from Transduction Laboratories, the anti-protein-disulfide isomerase (endoplasmic reticulum (ER) marker) was from Stressgene, and the 6C4 antibody (marker of late endosomes (12)) was a gift of Dr. Bruno Goud (Institut Curie, Paris, France). The Rab-EGFP (13) plasmids were generously provided by Dr. Robert Lodge (Université du Québec, Laval). Alexa®-labeled secondary antibodies were from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Cannabinoid ligands were from Tocris. All other chemicals were from Sigma.

DNA Constructs—The CB1R sequence was amplified without its stop codon from rat genomic DNA using the primers 5'-TTTGATCCATGAAGTCGATCATCCTAGAT and 3'-TTTACCGGTAGAGCCTCGGCGGACGT and inserted between the AgeI and BamHI sites of the pEGFP-N1 plasmid (Clontech), generating the CB1-EGFP construct. The CB1-WT construct coding for the untagged CB1R was obtained by inserting a stop codon into the CB1-EGFP sequence at the end of the CB1R coding sequence using the QuikChange™ mutagenesis system (Stratagene). All constructs were verified by full-length sequencing.

Cell Culture and Transfection—HEK-293 cells (ATCC CRL-1573) cultivated in minimal essential medium, 7.5% fetal calf serum (Invitrogen) were transfected in 6-well plates with 0.8 µg of CB1-EGFP plasmid DNA using Effectene reagent (Qiagen). For the Rab-EGFP experiments, cells were co-transfected with 0.4 µg of Rab-EGFP plasmid. Lilly pork kidney cells (LLC-PK1; ATCC CL-101) were grown and transfected as previously described (14). Neuroblastoma SHSY-5Y cells (ATCC CRL-2266) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and transfected with 0.8 µg of plasmid CB1-EGFP DNA using Effectene.

Pharmacological Assays in HEK-293 Cells—For the cAMP assay, a bioluminescent assay was performed following the manufacturer's instructions (Tropix). Briefly, cells seeded in precoated 96-well plates were preincubated the next day 15 min at 37 °C with phosphate-buffered saline, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM isobutylmethylxanthine, 1 µM RO20-1724 and then incubated for 15 min at 37 °C in the presence of 10 µM forskolin and processed for bioluminescent assay. For CB1R trafficking experiments, cells were seeded 48–72 h after transfection on polyallylamine-treated chambered coverglass 8-well slides (Labtek, Nunc) and assayed as described previously (11). Briefly, after a 1-h preincubation with 70 µM cycloheximide, cells were incubated for 15 min at 4 °C in Earle's buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂·6H₂O, 25 mM HEPES, pH 7.6) supplemented with 0.2% bovine serum albumin, 0.01% glucose, 0.08 mM phenanthroline, and 70 µM cycloheximide. Cells were then incubated with ligands in supplemented Earle's buffer for 30 min at 4 °C, before being incubated at 37 °C for various periods of time. After incubation, cells were washed with ice-cold Earle's buffer and fixed.

Immunohistochemistry—The specificity of the C-Ter, L14, and N-Ter antibodies was verified by colocalization of immunostaining with GFP fluorescence in CB1-EGFP-expressing cells, and negative controls were performed either by omitting the primary antibody or by depleting the primary antibody with corresponding blocking peptides, resulting in a complete loss of immunolabeling. The staining pattern of the C-Ter antibody and that of the L14 antibody were similar. For immunostaining of fixed cells, HEK-293 cells were fixed for 15 min in phosphate-buffered saline, 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100, immunostained for 1 h for CB1R using the C-Ter or L14 primary antibody diluted to 1:1000 at room temperature, and incubated for 30 min with anti-rabbit Alexa® 568 secondary antibody diluted to 1:400 at room temperature. For live immunostaining of surface receptors, cells were incubated for 5 min at the end of treatments in supplemented minimal essential medium with N-Ter antibody diluted to 1:400. Cells were fixed with phosphate-buffered saline, 4% paraformaldehyde and incubated for 30 min at room temperature with anti-rabbit Alexa® 568 secondary antibody diluted to 1:400. For live antibody feeding, cells were incubated for 2 h at 37 °C in supplemented minimal essential medium with N-Ter antibody diluted to 1:200 and fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were then incubated with anti-rabbit Alexa® 568 secondary antibody without or after permeabilization with

0.1% Triton X-100. For transferrin uptake experiments, cells were placed in serum-free minimal essential medium for 1 h and incubated with Cy3-Tf diluted to 1:400 for 1 h at 37 °C before fixation.

Cell Microscopy—For confocal microscopy, images (1024 × 1024 pixels) of individual cells were obtained on a Leica TCS NT confocal laser-scanning microscope by the use of a × 63, numerical aperture 1.4 oil immersion objective and × 4 zoom, resulting in a pixel size of 38.75 nm. Excitation was done at 488 nm, and fluorescence detection used a 525 ± 25-nm bandpass filter. Each image was realized on the equatorial cross-section through the cell that maximized nuclear diameter. Cells were randomly chosen in the well for each condition, with phenotypic consideration to avoid dead, dividing, or highly CB1R-overexpressing cells. In our protocol, cells are fixed 2–4 h (depending from the incubation length) after seeding, displaying a rather spherical form that allows precise equatorial optical sectioning and facilitates quantification. Co-detection of EGFP and red fluorescence (Cy3 or Alexa® 568) was done by excitation at 488 and 568 nm, using simultaneous detection with 525 ± 25-nm bandpass and >590-nm longpass filters.

For live cell imaging, CB1-EGFP-transfected HEK-293 cells were imaged on the ultrafast 4/5D deconvolution imaging system at Institut Curie (Paris, France) (15), using a Leica DM-IRBE microscope equipped with a × 100, numerical aperture 1.4 objective and a temperature-controlled box at 37 °C (The Box & The Cube, LIS). Stacks of images with a 0.2-µm Z step (~10–15 frames/stack) were acquired every 3 s for 5 min. After deconvolution (15), stacks were projected along the z axis using Metamorph Software (Universal Imaging Corp.).

Image Quantification—Confocal images were used to quantify the subcellular distribution and translocation of CB1R (11, 16). In-house-developed macro algorithms (available on request), written for the public domain Object Image software (available on the World Wide Web at simon.bio.uva.nl/object-image.html), were used to measure the subcellular distribution of the CB1Rs in HEK-293 cells. We measured mean fluorescence density values *S*, *C*, and *N*, corresponding to the surface (measured from the edge of the cell to 300 nm inside), cytoplasm, and nucleus of the cell. The nuclear fluorescence *N*, corresponding to the background, was subtracted from the *S* and *C* values, which, once multiplied by the respective areas, yielded the *S'* and *C'* total specific fluorescence. The displayed result is the *S'/C'* ratio that we call the membrane fluorescence ratio (MFR). The mean cell fluorescence, measuring the CB1R expression level in individual cells, was obtained by measuring the background-corrected mean density of the total cellular area (surface and cytoplasm).

RESULTS

CB1-EGFP Is Functional and Displays a Predominantly Intracellular Localization in HEK-293 Cells—In order to directly visualize and quantify the traffic of the CB1R, we created a chimeric protein by fusing EGFP to the C terminus end of the CB1R (CB1-EGFP). CB1R activation results in cAMP inhibition by negatively regulating adenylate cyclase activity (6). In nontransfected HEK-293 cells, forskolin stimulation induces a 37 ± 1.03-fold accumulation of cAMP. In contrast, cells transiently expressing the wild type CB1R (CB1-WT) or CB1-EGFP show a 2-fold lower level of cAMP accumulation, with a stimulation factor of 17.3 ± 0.51 and 19.8 ± 0.28, respectively (Fig. 1A). Thus, CB1R exerts a constitutive inhibitory effect on cAMP accumulation in HEK-293 cells, consistent with previous data obtained in CHO cells (7) or rat brain membrane preparations (17). This effect is similar for CB1-WT and CB1-EGFP, showing that CB1-EGFP is functional.

Strikingly, observation of CB1-EGFP-expressing HEK-293 cells by confocal microscopy shows that CB1-EGFP receptors are localized both on the plasma membrane and in intracellular vesicles (Fig. 1B). We quantified CB1-EGFP subcellular distribution on confocal images by measuring the MFR, which is the ratio of plasma membrane fluorescence over intracellular fluorescence (see "Experimental Procedures"). Quantification of CB1-EGFP distribution on equatorial confocal sections of individual cells leads to a MFR of 0.19 ± 0.02 for control cells in a typical experiment (see Figs. 1E and 4, A (a) and B). If we translate this value to express the percentage of CB1Rs that are intracellular, the result shows that ~85% of CB1Rs are

² K. Mackie, personal communication.

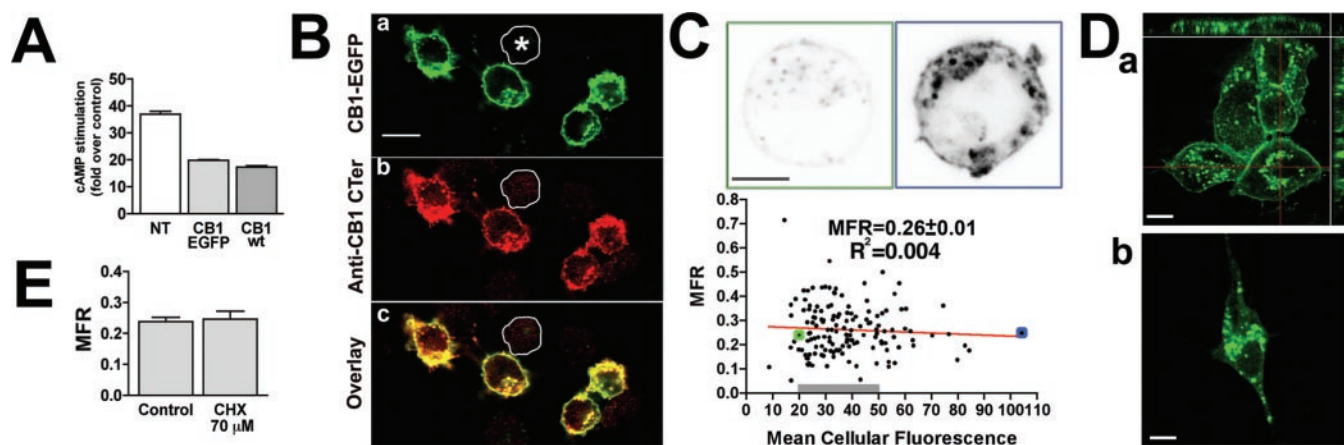


FIG. 1. **CB1-EGFP is functional and localizes in several cell lines to both the plasma membrane and endosomes.** *A*, forskolin-stimulated cAMP production of HEK-293 cells, untransfected (NT) or transfected with CB1-EGFP or CB1-WT. *B*, HEK-293 transiently expressing CB1-EGFP (*a*), stained with C-Ter antibody (*b*), with overlay (*c*). Scale bar, 20 μ m. Note that untransfected cells (*) are not labeled by the C-Ter antibody, showing its specificity (*b*). *C*, graph showing the MFR (ratio of the corrected total fluorescences of surface versus cytoplasm, as described under “Experimental Procedures”) versus the mean cellular intensity (as a measure of CB1-EGFP expression level in each cell) for 145 CB1-EGFP-transfected HEK-293 cells. The MFR and the expression level are not correlated ($R^2 < 0.005$). The gray bar shows the range of qualifying transfection levels for quantification in subsequent experiments (mean cellular fluorescence from ~ 20 to ~ 50). On top are shown two cells that correspond to a very low CB1R-expressing cell (left, green dot on graph) and a highly CB1R-expressing cell (right, blue dot on graph). The two images were acquired and post-treated identically, and the two cells show the same distribution pattern for CB1R. Scale bar, 5 μ m. *D*, *a*, confocal image of epithelial LLC-PK1 cells expressing CB1-EGFP. Scale bar, 10 μ m. *b*, confocal image of a neuroblastoma SHSY-5Y cell expressing CB1-EGFP. Scale bar, 10 μ m. *E*, quantification of the MFR for CB1-EGFP-expressing cells after a 4-h incubation with or without 70 μ M cycloheximide (CHX). $n = 8$ cells. Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments.

localized to cytoplasmic vesicles in the equatorial plane of control cells.

This distribution could result from heterologous overexpression of CB1R in HEK-293 cells. HEK-293 cells transiently transfected with CB1-EGFP show a large range of expression levels. We thus quantified 145 cells showing large variations in the mean cell fluorescence (indicating expression level) and of membrane fluorescence ratio (representing subcellular distribution). The resulting graph (Fig. 1C) shows that there is no correlation between the expression level and the membrane/cytoplasm distribution, since the correlation coefficient R^2 is very low (< 0.005) and the slope of the correlation is weakly negative, not significantly different from zero, showing that the MFR does not vary with the mean cell fluorescence. Moreover, GFP-tagged AT_{1A} angiotensin II (11) or somatostatin SSTR2 receptors expressed at the same levels in HEK-293 cells localize predominantly at the plasma membrane (data not shown), showing that overexpression is not the cause of intracellular receptor accumulation. Furthermore, it is not due to the GFP tag, since untagged CB1-WT receptors detected by immunohistochemistry display the same intracellular distribution (data not shown). Finally, a similar distribution is observed in cell lines other than HEK-293 such as polarized epithelial LLC-PK1 cells (14) (Fig. 1D, *a*) or SHSY-5Y neuroblastoma cells (Fig. 1D, *b*), where CB1-EGFP also localizes predominantly in intracellular vesicles.

Intracellular CB1R Distribution Indicates Endocytic Origin—Intracellular CB1R localization has been previously reported (18, 19), and these intracellular receptors could presumably correspond to maturing receptors in the neosynthetic pathway. To assess the proportion of newly synthesized intracellular CB1R receptors, we monitored the distribution of CB1-EGFP receptors after continuous treatment (1–4 h) with cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. This treatment does not change the distribution of CB1Rs (Fig. 1E), suggesting that neosynthesis is not the primary source of intracellular CB1R fluorescence.

We also performed labeling of various intracellular compartments of cycloheximide-treated CB1-EGFP-expressing cells (Fig. 2): Golgi apparatus with anti-GM130 antibody (*a–d*), ER

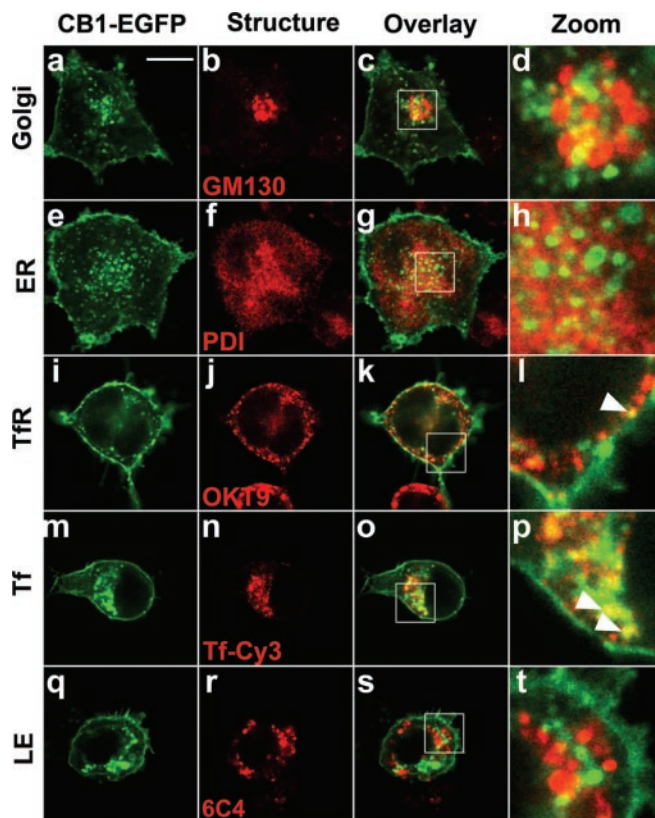


FIG. 2. **Immunolabeling pattern of intracellular CB1R suggest endocytic origin.** CB1-EGFP-expressing cells with immunostaining of intracellular structures: Golgi apparatus (*a–d*), ER (*e–h*), TfR (*i–l*), endocytosed Cy3-transferrin-containing endosomes (*Tf*; *m–p*), and late endosomes (*LE*; *q–t*). Scale bar, 10 μ m. Insets (*d*, *h*, *l*, *p*, and *t*) show higher magnification of the zone boxed in *c*, *g*, *k*, *o*, and *s*, with colocalization of receptor clusters with TfR- or Tf-positive endosomes (arrowheads).

with anti-protein-disulfide isomerase antibody (*e–h*), transferrin receptor (TfR)-containing endosomes with anti-TfR OKT9 antibody (*i–l*), endocytosed transferrin (Tf) with Cy3-

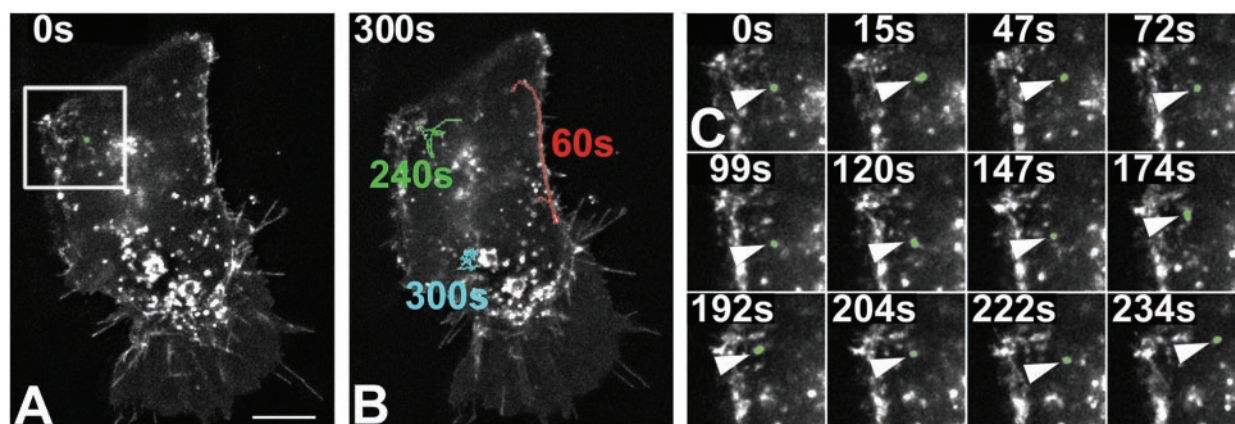


FIG. 3. **Live imaging of CB1-EGFP in HEK-293 cells.** Four-dimensional deconvoluted time lapse imaging of a HEK-293 cell expressing CB1-EGFP. Z-stacks of 15 images, with a 0.2- μm step, were acquired every 3 s for 5 min. Shown are maximum projections of deconvoluted stacks. A, cell at 0 s. Scale bar, 10 μm . B, cell at the end of acquisition (300 s), with trajectories of three vesicles during acquisition. The times on trajectories correspond to the total times during which the vesicle could be tracked. C, zoom corresponding to box on whole cell image (A) at different time points, showing a mobile endosome highlighted in green (arrowhead, green trajectory on B).

conjugated Tf (*m-p*), and late endosomes with 6C4 antibody (*q-t*). CB1Rs do not show major colocalization with neosynthesis (Golgi and ER) or with degradative (late endosomes) pathways. Intracellular CB1R-positive vesicles are morphologically similar to TfR-positive endosomes, and several TfR- or Tf-positive endosomes contain CB1R (Fig. 2, *i-p*, arrowheads in *l* and *p*), but CB1Rs do not significantly colocalize with TfRs that appear in perinuclear recycling endosomes. Thus, the majority of intracellular CB1Rs are not likely to correspond to maturing or degrading receptors but rather have an endocytic origin.

Dynamics of CB1-EGFP in Living HEK-293 Cells—Live cell imaging using four-dimensional deconvolution microscopy allowed us to gain insights into dynamics of CB1-EGFP in HEK cells (Fig. 3 and Movie 1 in the Supplementary Material). Using fast acquisition rates (one Z-stack every 3 s), we observed living CB1-EGFP-transfected HEK-293 cells. This allowed us to track CB1-EGFP-containing vesicles moving across the cytoplasm with remarkable spatial and temporal resolution (Fig. 3, B and C). Vesicles show various dynamics: certain ones are rapidly moving over long distances across cytoplasm (*red trajectory* in Fig. 3B), and others show rapid movements between periods of relative immobility (see *green trajectory* in Fig. 3B and montage in Fig. 3C), whereas others are more static (see *blue trajectory* in Fig. 3B). Events of fission and fusion between vesicles or with plasma membrane can also be observed. Thus, CB1-EGFP show very fast dynamics in HEK-293 cells that are compatible with possible constitutive trafficking of CB1R between plasma membrane and cytoplasm.

CB1Rs Redistribute upon Treatment with Agonist and Inverse Agonist—Using confocal microscopy, we monitored the effects of various cannabinoid ligands on the subcellular distribution of CB1-EGFP by measuring the MFR variation. In parallel, we labeled surface receptors with the N-Ter antibody, directed against an extracellular epitope in the amino terminus of the receptor. Incubation for 3 h with agonist WIN55,212-2 (WIN; 330 nM) (Fig. 4A) or CP 55,940 (1 μM , data not shown) leads to complete endocytosis of the plasma membrane-localized population of CB1Rs (Fig. 4, A and B), with a 75% decrease of the MFR and an almost complete disappearance of surface receptor labeling (Fig. 4A, e). Two other CB1R agonists: methanandamide (*mAn*), a stable analog of the endocannabinoid anandamide, and the putative endocannabinoid noladin ether (*NE*) also provoke CB1R endocytosis, with a decrease of the MFR to values close to that induced by WIN (Fig. 4B). These results are consistent with previous observations of CB1R endocytosis (18, 20–22).

Next, we investigated the effects of the cannabinoid inverse agonist AM281 (23), an analog of SR141716A (Rimonabant). AM281 is able to antagonize endocytosis induced by the agonist WIN (Fig. 4B), restoring the MFR of control cells. Importantly, when applied alone, AM281 (7 μM for 3 h) induces translocation of intracellular CB1Rs toward the plasma membrane, clearing the cytoplasm of CB1R-containing vesicles (Fig. 4A, g). The antibody-labeled surface population rises (Fig. 4A, h), accompanied by a 2-fold increase of the MFR (Fig. 4B). Since the amount of total CB1-EGFP fluorescence does not change notably after incubation with AM281 (data not shown), the up-regulated plasma membrane-localized CB1Rs are most likely to be translocated (externalized) from intracellular endosomes. The structurally related inverse agonist AM251 has a similar effect (data not shown). Control experiments using immunodetection of the untagged CB1-WT receptor demonstrated that untagged CB1R trafficking induced by WIN and AM281 (data not shown) is identical to CB1-EGFP.

To further characterize CB1R endocytosis and externalization, concentration-response and kinetic curves for translocation induced by WIN and AM281 were established (Fig. 4C). WIN-induced endocytosis is dose-dependent with an EC_{50} of 2.07 ± 0.01 nM, and AM281 induces dose-dependent externalization with an EC_{50} of 3.41 ± 0.22 nM (Fig. 4C, a), values that are close to the K_d reported for WIN and AM281 (24, 25). Interestingly, kinetics of CB1R endocytosis and externalization (Fig. 4C, b) are clearly different. WIN induces an exponential decay of the membrane population of CB1Rs, with a half-time of 4.3 ± 0.6 min, leading to total endocytosis after 30 min, a value that is typical for GPCR endocytosis (26). AM281-induced externalization is slower, with a linear increase of the MFR ratio reaching a plateau after 2 h.

CB1R Is Constitutively Endocytosed and AM281-induced Externalization Is Recycling-dependent—In order to directly demonstrate constitutive endocytosis, we incubated live CB1R-expressing HEK-293 cells with the N-Ter antibody. After 2 h of incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, the antibody is detected in intracellular vesicles (Fig. 5A, e), showing constitutive endocytosis of CB1R. One could predict that if receptors were constitutively endocytosed, blocking endocytosis without interfering with recycling would lead to accumulation of receptors on the plasma membrane, mimicking the effect of AM281. Acute depletion of plasma membrane cholesterol content by the use of methyl- β -cyclodextrin ($\text{M}\beta\text{CD}$) has been shown to inhibit clathrin-mediated endocytosis of the TfR, whereas recycling of the TfR is not modified by this treatment (27). Indeed, after incubation with

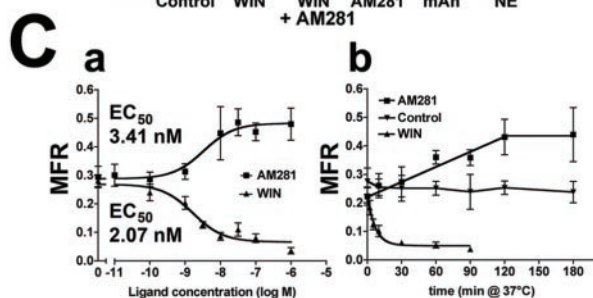
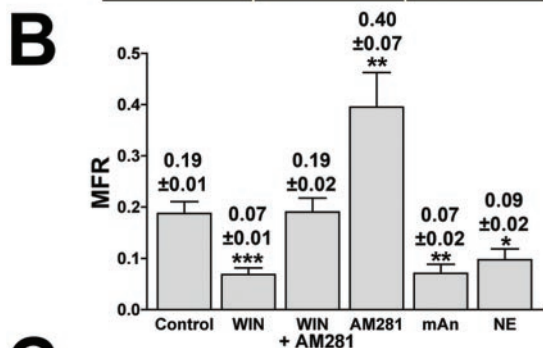
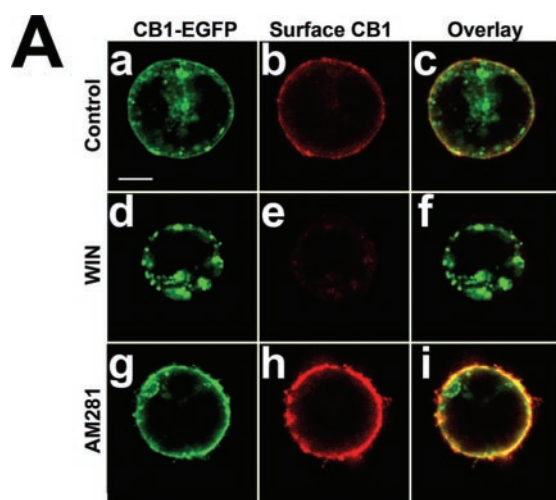


FIG. 4. Translocation of CB1R after pharmacological treatments in HEK-293 cells. A, confocal images of HEK-293 cells transfected with CB1-EGFP and treated for 3 h at 37 °C in the presence of cycloheximide. Scale bar, 5 μ m. a–c, equatorial section of an untreated cell showing EGFP fluorescence on the plasma membrane and in small vesicles. a, CB1-EGFP fluorescence; b, surface receptors detected with N-Ter antibody; c, overlay. d–f, endocytosis after incubation with 330 nM agonist WIN. g–i, externalization after treatment with 7 μ M inverse agonist AM281. B, quantification of the subcellular distribution of CB1-EGFP following incubation with ligands at a concentration corresponding to 100 times K_d : 330 nM for WIN, 9 μ M for methanandamide (mAn), and 2 μ M for noldin ether (NE). Inverse agonist AM281 was applied at a 500 K_d concentration (7 μ M). For each condition, the MFR was measured for a population of 8–12 cells. C, a, concentration-response curves for WIN and AM281 effects on subcellular CB1-EGFP distribution. Cells were preincubated for 30 min at 4 °C with various concentration of ligand and then incubated at 37 °C for 20 min without ligand for WIN (pulse-chase) or 3 h in the presence of ligand for AM281. b, time course of the effects of WIN and AM281 on subcellular CB1R distribution. Cells were preincubated for 30 min at 4 °C with 330 nM WIN or 7 μ M AM281 and then incubated at 37 °C for various periods of time in the absence (WIN) or presence (AM281) of ligand. Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, compared with control.

10 mM M β CD for 2 h, TfR endocytosis is strongly inhibited, and recycled TfRs accumulate on the plasma membrane (Fig. 5B, e and g). In a similar way, CB1Rs are strongly externalized by this treatment (Fig. 5B, d and g), further indicating that the formation of the intracellular pool of receptors is a result of constitutive endocytosis.

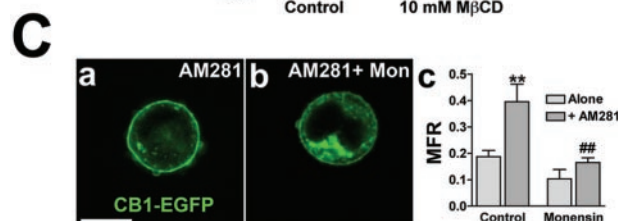
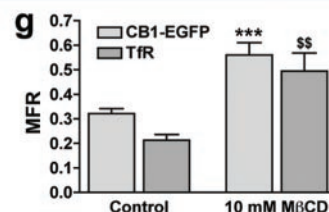
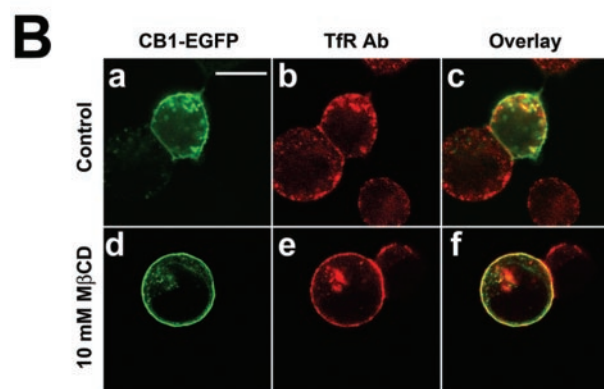
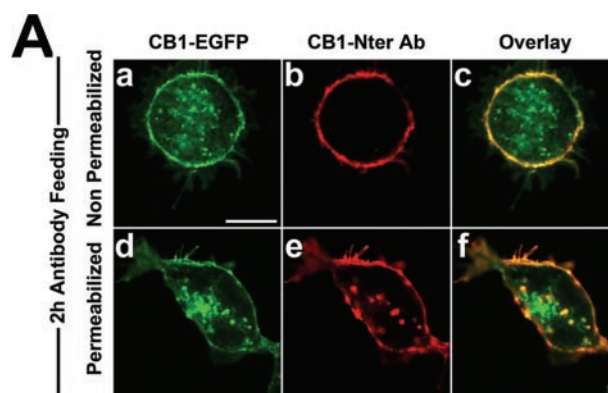


FIG. 5. CB1R is constitutively endocytosed in HEK-293 cells, and AM281-induced externalization is recycling-dependent. A, live N-Ter antibody feeding of CB1-EGFP expressing cells. Cells were incubated for 2 h with N-ter antibody and fixed. Immunolabeling was performed without (a–c) or after (d–f) permeabilization with Triton X-100. Scale bar, 10 μ m. B, effect of inhibition of endocytosis by acute depletion of plasma membrane cholesterol on the subcellular distribution of TfR and CB1R. Confocal images of CB1-EGFP-transfected HEK-293 cells fixed after 2 h of incubation at 37 °C with vehicle (a–c), 10 mM M β CD for acute depletion of plasma membrane cholesterol (d–f), CB1-EGFP fluorescence (a and d), TfR immunolabeling (b and e), and overlay (c and f). Scale bar, 10 μ m. g, quantification of the effect of M β CD treatment ($n = 8$ –15 cells). Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments. ***, $p < 0.001$ for significance of difference between control and M β CD treatment for CB1-EGFP. \$\$, $p < 0.01$ for significance between control and M β CD treatment for TfR labeling. C, effects of recycling inhibitor monensin on CB1R externalization. Confocal images of CB1-EGFP transfected HEK-293 cells and treated 3 h at 37 °C with 7 μ M inverse agonist AM281 alone (a) or together with monensin (Mon; 70 nM) (b). Scale bar, 10 μ m. c, quantification of the effects of monensin on the subcellular distribution and AM281-induced externalization of CB1-EGFP ($n = 8$ cells). Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments. **, $p < 0.01$; for significance of difference between distribution with vehicle-treated cells. ##, $p < 0.01$ for significance between inverse agonist-induced externalization with and without recycling inhibitor. Scale bar, 5 μ m.

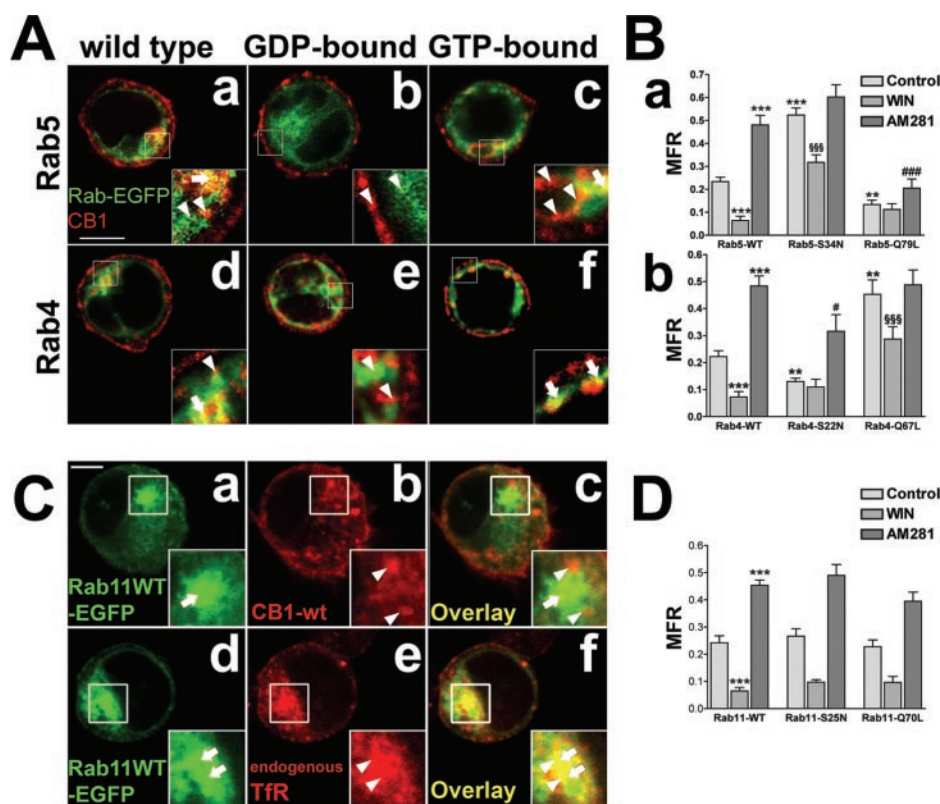


FIG. 6. The constitutive endocytosis/recycling cycle of CB1R is regulated by Rab5 and Rab4 GTPases. HEK-293 cells were cotransfected with the CB1-WT receptor and EGFP-tagged wild type (*RabWT*) or mutant Rab GTPases. Two days later, cells were incubated for 3 h in the presence of vehicle, 660 nM WIN, or 7 μ M AM281, permeabilized, and immunostained for CB1R using the L14 antibody and Alexa@-568 anti-rabbit secondary antibody. **A**, confocal images of representative cells for control conditions with different mutants (*columns*) of Rab5 or Rab4 GTPases (*rows*). Green, Rab-EGFP; red, CB1R immunolabeling; scale bar, 5 μ m. The insets show higher magnification of cells, with colocalization of receptor clusters with Rab-positive endosomes (*arrows*) or noncolocalized structures (*arrowheads*). **B**, quantification of the receptor distribution in cells expressing Rab5 (*a*) or Rab4 (*b*) mutants after a 3-h incubation at 37 $^{\circ}$ C with vehicle (*Control*), 660 nM WIN, or 7 μ M AM281 (*n* = 8 cells). Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments. **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001, compared with vehicle-treated, RabWT-transfected cells; \$\$\$, *p* < 0.001 compared with WIN-treated, RabWT-transfected cells; #, *p* < 0.05; ###, *p* < 0.001 compared with AM281-treated, RabWT-transfected cells. **C**, HEK-293 cells expressing Rab11WT-EGFP and CB1-WT immunolabeled for CB1R with the L14 antibody (*a-c*) or expressing Rab11WT-EGFP alone immunolabeled for endogenous TfR using the OKT9 antibody (*d-f*). Scale bar, 5 μ m. The insets show higher magnification of cells; Rab11 is present mostly in perinuclear recycling endosomes (*a* and *d*, *arrows*), and CB1Rs do not significantly colocalize (*b*, *arrowheads*), whereas TfRs show consistent colocalization (*e*, *arrowheads*) with this compartment. **D**, quantification of the receptor distribution in cells expressing Rab11 mutants after a 3-h incubation at 37 $^{\circ}$ C with vehicle (*Control*), 660 nM WIN, or 7 μ M AM281 (*n* = 8 cells). Results are expressed as mean \pm S.E. and are representative of two independent experiments. ***, *p* < 0.001 compared with vehicle-treated, RabWT-transfected cells.

If AM281 acts by sequestering CB1Rs that have been delivered to the plasma membrane by constitutive recycling, blocking the recycling process would antagonize the AM281 effect. Monensin, a potent inhibitor of recycling (11, 25), strongly inhibits the AM281-induced externalization (Fig. 5C). In addition, other compounds that have been shown to inhibit recycling of the TfR receptor (28, 29) and of the AT_{1A} angiotensin II receptor (13), the phosphoinositide 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002, and brefeldin A also inhibit CB1R externalization induced by AM281 (data not shown). These compounds have a broad range of cellular effects; they unravel the constitutive endocytosis of CB1R and indicate that AM281 may act through constitutive recycling but do not allow unambiguous identification of the intracellular pathways involved.

Constitutive Cycling of CB1R Is Regulated by the Small GTPases Rab5 and Rab4 but Not Rab11—We thus sought to identify the molecular partners that control CB1R endocytosis and recycling by studying the role of three members of the Rab family of small GTPases (30). Rab5 is required for the delivery of membrane proteins from the plasma membrane to early endosomes (31), Rab11 has been shown to control the slow component of recycling from the perinuclear recycling endosomes to the plasma membrane (32), whereas Rab4 was suggested to play a role in both slow and fast recycling to the

plasma membrane (33). Rab4, Rab5, and Rab11 have been shown to control the agonist-mediated endocytosis and recycling of many GPCRs (34, 35). However, the role of these Rabs has never been studied to specifically address constitutive trafficking of a constitutively active GPCR. In HEK-293 cells expressing EGFP-tagged Rab5, Rab4, or Rab11, we observed that cotransfected CB1Rs colocalized mainly with Rab5 and Rab4 (Fig. 6A, *arrows*) but not significantly with Rab11 (Fig. 6C). Control experiments show that the amount of wild type Rab-EGFP plasmids used for cotransfection does not interfere with steady-state CB1R localization and ligand-induced translocation (Fig. 6, B and D; MFR for Rab4-WT-, Rab5-WT-, and Rab11-WT-transfected cells is not significantly different from the controls shown in Fig. 4B).

We then used GDP-bound (dominant negative) and GTP-bound (dominant active) Rab mutants fused with EGFP (13) to assess the influence of each Rab protein on the distribution of CB1Rs and their ligand-induced translocation. Expression of GDP-bound (dominant negative) Rab5-S34N induces an endocytosis deficit for CB1Rs (Fig. 6A, *b*), shifting the MFR toward higher values for all pharmacological conditions (Fig. 6B, *a*). Furthermore, endocytosis of CB1Rs is reduced after incubation with WIN, suggesting that endocytosis is severely impaired. On the contrary, expression of GTP-bound (dominant active) Rab5-

Q79L favors endocytosis, leading to cells containing large aberrant vesicles (Fig. 6A, c), as described previously (13, 36). The CB1R is endocytosed into these vesicles, leading to a drop of the MFR. Interestingly, incubation with AM281 is able to externalize CB1R, but a considerable amount of receptor remains sequestered in these large vesicles (Fig. 6B, a).

Effects of Rab4 mutants (Fig. 6A, d–f) are opposite to those of Rab5 mutants, showing that Rab4 is involved in CB1R recycling. Expression of GDP-bound Rab4-S22N impairs recycling, leading to a steady-state distribution with more endocytosed receptors, and AM281 externalizes these receptors less efficiently (Fig. 6B, b). Notably, the intracellular pool of CB1Rs does not colocalize with the Rab4-S22N-EGFP (Fig. 6A, e). Furthermore, cotransfection of the GTP-bound Rab4-Q67L externalizes the receptors and is able to antagonize WIN-induced endocytosis. The remaining intracellular pool of receptors colocalizes with Rab4-Q67L-EGFP-positive vesicles (Fig. 6A, f).

Finally, constitutive endocytosis and recycling of CB1R is not dependent on Rab11, since no change occurs in the distribution and translocation of CB1R when Rab11 mutants are co-expressed (Fig. 6, C and D). CB1R does not significantly colocalize with Rab11 and seems to be largely excluded from Rab11-positive perinuclear recycling endosomes (Fig. 6C, a–c), and the few endosomes that are Rab11 and CB1R-positive are rather likely to be Rab5-, Rab11-positive sorting endosomes (37). The capacity to modify GPCR trafficking (32) of the Rab11 mutants employed in our study was verified using TtR immunolabeling. Contrary to CB1Rs, TtRs are largely present in Rab11-positive perinuclear recycling endosomes (Fig. 6C, d–f). Rab11 mutants were able to modulate TtR cycling, with enhanced plasma membrane localization of TtR in Rab11-WT- or Rab11-Q70L (GTP-bound)-transfected cells compared with nontransfected cells, whereas transfection of Rab11-S26N (GDP-bound) leads to intracellular accumulation of TtRs compared with Rab11-WT-transfected cells (data not shown). Thus, the lack of effects of Rab11 mutants on CB1R trafficking was not due to inefficient Rab11 mutants but rather to the absence of CB1R in Rab11-mediated trafficking pathways. CB1R are thus likely to constitutively cycle between plasma membrane and endosomes through Rab5-dependent constitutive endocytosis and Rab4-dependent constitutive recycling.

DISCUSSION

We have investigated spontaneous and ligand-induced intracellular translocation of CB1R in order to elucidate how an important pharmacological property of this receptor, the high level of constitutive activity (3), influences its functional trafficking. In HEK-293 cells as well as in LLC-PK1 epithelial cells or SHSY-5Y neuroblastoma cells, CB1-EGFP is predominantly localized in endosomes at steady state. Detailed analysis in HEK-293 cells shows that this distribution is a result of constitutive activity-dependent cycling of CB1R between the plasma membrane and endosomes, mediated by the small GTPases Rab5 and Rab4.

We used a GFP chimera protein to allow direct visualization of CB1R. Such fusion proteins are now widely used to study protein trafficking (38), and their usefulness is amply demonstrated for GPCRs (39, 40). In our study, we first verified that CB1-EGFP was functional by measuring constitutive inhibition of cAMP accumulation after forskolin stimulation, showing that tagged CB1-EGFP and untagged CB1-WT behaved similarly. Moreover, WIN-induced endocytosis and AM281-induced externalization were also verified after immunolabeling of CB1-WT (see Rabs-EGFP experiments), showing no differences with CB1-EGFP. Thus, CB1-EGFP is a fusion protein whose pharmacology and trafficking are similar to CB1-WT.

At steady state, CB1-EGFP is expressed on the plasma mem-

brane, but a substantial proportion (~85% of total fluorescence) of receptors is also present in intracellular vesicles. The presence of intracellular CB1 receptors was also observed in the pioneering studies of Hsieh *et al.* (18) in AtT20 cells and of Coutts *et al.* (19) in hippocampal neurons. Intuitively, CB1R-containing intracellular vesicles could correspond to maturing receptors in the neosynthetic pathway. In fact, several constitutively active GPCRs, like mutants of the vasopressin V2 receptor (41) or the wild type δ -opioid receptor (42), are retained in the ER before reaching the cell surface, leading to a mostly intracellular phenotype. However, we found no effect of protein synthesis inhibition by cycloheximide (up to 4 h) on the intracellular distribution of CB1-EGFP. Moreover, the colocalization of CB1R-containing endosomes with Rab5- and Rab4-positive endosomes argues for localization of intracellular CB1Rs in endocytosis and recycling pathways. Finally, CB1-EGFP-positive vesicles do not significantly colocalize with organelles associated with synthesis (Golgi or ER) but rather resemble endocytic vesicles (endosomes) like those positive for TtR. The fact that only few endosomes contain both TtR and CB1R suggests that sorting events separate endocytosed CB1R and TtR, as described for the β_2 -adrenergic receptor and the TtR (43). Interestingly, we also detect clear segregation between CB1R and TtR in a downstream portion of the endocytic pathway, where CB1Rs avoid Rab11-positive perinuclear recycling endosomes, whereas TtRs are enriched in this compartment.

Our data suggest that CB1Rs are constitutively endocytosed. First, antibodies that bind an extracellular epitope of CB1R in live cells are spontaneously endocytosed and subsequently found inside endosomes. Second, inhibition of clathrin-mediated endocytosis by acute depletion of plasma membrane cholesterol (27) translocates both intracellular TtRs and CB1Rs to the plasma membrane, demonstrating that endocytosis is required to generate the intracellular population of CB1Rs, similarly to TtRs. Third, spontaneous endosomal accumulation of CB1R is blocked by coexpression of a GDP-bound (inactive) mutant of Rab5 and enhanced by the GTP-bound (active) mutant. These results imply that CB1Rs are constitutively endocytosed and use Rab5-mediated postendocytotic trafficking pathways, similarly to agonist-activated GPCRs like the AT_{1A} angiotensin II receptor, the β_2 adrenergic receptor, endothelin receptors, and D2 dopamine receptors (35).

Constitutive (*i.e.* tonic) endocytosis in the absence of ligand has also been observed for other wild type GPCRs such as chemokine CXCR4 receptor (44), thyrotropin receptor (25), M2 muscarinic receptor (45), thrombin receptor (46), and thromboxane A2 receptor (47). However, these studies do not address the relationship between constitutive activity and tonic endocytosis.

The relationship between constitutive activity and constitutive endocytosis of the CB1R is revealed by the translocation effect of inverse agonist treatment. Treatment with the inverse agonist AM281 translocates intracellular CB1Rs to the plasma membrane, as first observed by Rinaldi-Carmona *et al.* (21), probably due to stabilization of the inactive form of the receptor that does not internalize. Inverse agonist-induced externalization of a constitutively active GPCRs has also been shown previously for mutants of AT_{1A} (11), for vasopressin V2, and for α_{1B} adrenergic receptor (48). The externalization process is clearly different from the up-regulation phenomenon, a general up-regulation of receptor expression level occurring after long term (~24-h) treatment with inverse agonists and requiring protein synthesis, as shown for constitutively active mutants of the α_{1B} adrenergic receptor (49). Here, the relatively short time (~2 h) necessary to reach maximal inverse agonist effect, and

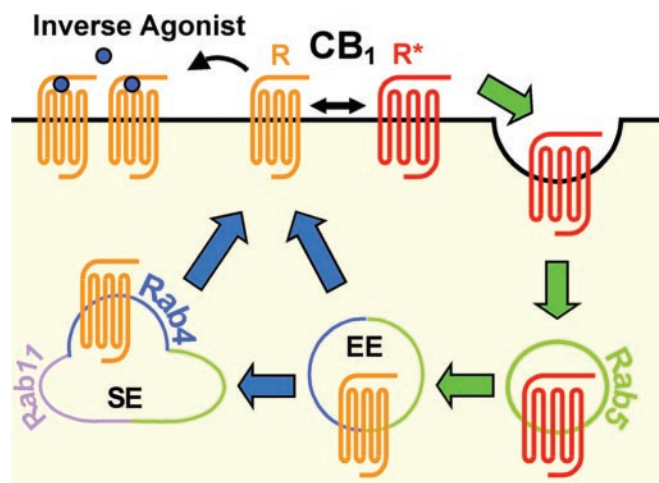


FIG. 7. Proposed model for the constitutive trafficking of the CB1R. Plasma membrane-localized CB1Rs are in an equilibrium between active R* (red) and inactive R (orange) states. Once activated, either constitutively or by an agonist ligand, the receptor is internalized through a Rab5-mediated pathway (green arrow). The receptor then travels through early endosomes (EE) and sorting endosomes (SE) and is recycled back to the plasma membrane by Rab4-mediated recycling pathways (blue arrows). Since recycling is slower than endocytosis, the majority of receptors are localized to endosomes at steady state. The inverse agonist, which stabilizes the inactive conformation of the receptor, leads to externalization by sequestering recycled receptors on the plasma membrane.

the constant use of cycloheximide allows to rule out protein synthesis as the primary source of externalized receptors. Furthermore, the total amount of CB1-EGFP fluorescence in cells does not change notably along the time courses studied. The alternative hypothesis of immature receptors being translocated from the ER to the plasma membrane by a chaperone effect of membrane-permeant inverse agonists, as shown for mutant vasopressin V2 receptors (41) or δ opioid receptors (50), seems also not applicable here; intracellular CB1Rs are not localized in the ER and are of endocytic origin. Furthermore, AM281-induced externalization depends on Rab4 and is blocked by monensin, showing involvement of recycling pathways.

The intracellular CB1R population could result from internalization provoked by the presence of endogenous cannabinoid ligands secreted by the cells or present in the serum-containing medium, and, in this case, AM281 would act also as an antagonist. This possibility is difficult to formally exclude, since there is no neutral antagonist for the CB1R. However, we found no significant change in the CB1R distribution when we monitored CB1-EGFP-expressing HEK-293 cells up to 3 h after incubation with fresh, ligand-free buffer (see the control curve in Fig. 4C, b), indicating that basal endocytosis was not due to secreted cannabinoid ligands but rather due to the constitutive activity of CB1R.

To achieve externalization, there must be a mechanism that brings CB1Rs to the plasma membrane. Here we suggest that this mechanism is a constitutive recycling process; the majority of CB1Rs externalized by the inverse agonist are probably receptors that have been previously endocytosed. This constitutive recycling is dependent on Rab4, since a GDP-bound (inactive) mutant of Rab4 promotes intracellular CB1R accumulation, whereas a GTP-bound (active) mutant leads to externalization. Rab4 is considered to drive both recycling from early endosomes and recycling endosomes (37). Rab11 has been shown to drive slow recycling from perinuclear recycling endosomes (32). CB1R does not seem to pass through Rab11-positive perinuclear recycling endosomes, and Rab11 does not in-

tervene in constitutive trafficking of CB1R. For CB1R, the main recycling route seems to be Rab4-dependent, displaying relatively slow kinetics, since AM281-induced externalization is maximal after 2 h. Since recycling is slower than endocytosis, as shown by different kinetics of WIN and AM281 effects, the majority of CB1Rs is found in endosomes at steady state.

Thus, the CB1R is constitutively and permanently activated, endocytosed, and recycled, and inverse agonists externalize CB1R by inhibiting constitutive activation. Recently, constitutively active mutants of the AT₁ angiotensin II receptor were shown to participate in a similar cycle (11). Very recent work of Marion *et al.* (10) also reports constitutive endocytosis and inverse agonist-induced externalization of constitutively active forms of the 5HT_{2C} serotonin receptor, showing constitutive recruitment of β -arrestin 2. Here we extend the model of constitutive endocytosis for another constitutively active wild type GPCR, the CB1R, and we also identify the intracellular pathways implicated in this constitutive endocytosis and recycling. Our model of the constitutive trafficking cycle of CB1Rs between plasma membrane and endosomes is depicted in Fig. 7. The question of the physiological relevance of such a cycle remains open, and constitutive trafficking of CB1R in neurons is currently under investigation in our laboratory. Nevertheless, *in vivo* description of constitutively active endogenous H3 receptors (51), together with discovery of the first endogenous inverse agonists, the agouti-related peptide on the melanocortin MC1 receptor (52, 53), has paved the way toward new paradigms of GPCR physiology and deeper understanding of brain function.

Acknowledgments—We are grateful to Robert Lodge for offering the Rab-EGFP plasmids. We thank Ken Mackie for the L14 antibody and for critical reading of the manuscript. We thank Manuel They at the Institut Curie for four-dimensional deconvolution imaging, Sabine Bardin for help with cell culture and cellular assays, and Eric Clauser for discussion and assistance. We also thank Stéphanie Miserey-Lenkei and László Hunyady for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Howard, A. D., McAllister, G., Feighner, S. D., Liu, Q., Nargund, R. P., Van der Ploeg, L. H., and Patchett, A. A. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 132–140
- Ferguson, S. S. (2001) *Pharmacol. Rev.* **53**, 1–24
- Seifert, R., and Wenzel-Seifert, K. (2002) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**, 381–416
- Milligan, G., and Bond, R. A. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 468–474
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., and Bonner, T. I. (1990) *Nature* **346**, 561–564
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., and Pertwee, R. G. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54**, 161–202
- Bouaboula, M., Perrachon, S., Milligan, L., Canat, X., Rinaldi-Carmona, M., Portier, M., Barth, F., Calandra, B., Pecceu, F., Lupker, J., Maffrand, J. P., Le Fur, G., and Casellas, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22330–22339
- Pan, X., Ikeda, S. R., and Lewis, D. L. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 1064–1072
- Hillard, C. J., Muthian, S., and Kearn, C. S. (1999) *FEBS Lett.* **459**, 277–281
- Marion, S., Weiner, D. M., and Caron, M. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 2945–2954
- Miserey-Lenkei, S., Parnot, C., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5891–5901
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (1998) *Nature* **392**, 193–197
- Hunyady, L., Baukal, A. J., Gaborik, Z., Olivares-Reyes, J. A., Bor, M., Szaszak, M., Lodge, R., Catt, K. J., and Balla, T. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 1211–1222
- Darmon, M., Langlois, X., Suffisseau, L., Fattaccini, C. M., and Hamon, M. (1998) *J. Neurochem.* **71**, 2294–2303
- Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B., and Hernandez-Verdun, D. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 1097–1110
- Lenkei, Z., Beaudet, A., Chartrel, N., De Mota, N., Irinopoulou, T., Braun, B., Vaudry, H., and Llorens-Cortes, C. (2000) *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 1553–1564
- Landsman, R. S., Burkey, T. H., Consroe, P., Roeske, W. R., and Yamamura, H. I. (1997) *Eur. J. Pharmacol.* **334**, R1–R2
- Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., and Mackie, K. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 493–501
- Coutts, A. A., Anavi-Goffer, S., Ross, R. A., MacEwan, D. J., Mackie, K., Pertwee, R. G., and Irving, A. J. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 2425–2433
- Roche, J. P., Bounds, S., Brown, S., and Mackie, K. (1999) *Mol. Pharmacol.* **56**, 611–618

21. Rinaldi-Carmona, M., Le Duigou, A., Oustric, D., Barth, F., Bouaboula, M., Carayon, P., Casellas, P., and Le Fur, G. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287**, 1038–1047
22. Jin, W., Brown, S., Roche, J. P., Hsieh, C., Celver, J. P., Kovoov, A., Chavkin, C., and Mackie, K. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 3773–3780
23. Gatley, S. J., Lan, R., Pyatt, B., Gifford, A. N., Volkow, N. D., and Makriyannis, A. (1997) *Life Sci.* **61**, 191–197
24. Hillard, C. J., Manna, S., Greenberg, M. J., DiCamelli, R., Ross, R. A., Stevenson, L. A., Murphy, V., Pertwee, R. G., and Campbell, W. B. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1427–1433
25. Baratti-Elbaz, C., Ghinea, N., Lahuna, O., Loosfelt, H., Pichon, C., and Milgrom, E. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 1751–1765
26. Tsao, P., Cao, T., and von Zastrow, M. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 91–96
27. Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M. A., Keen, J. H., and McGraw, T. E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6775–6780
28. van Dam, E. M., and Stoorvogel, W. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 169–182
29. van Dam, E. M., Ten Broeke, T., Jansen, K., Spijkers, P., and Stoorvogel, W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 48876–48883
30. Zerial, M., and McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 107–117
31. Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992) *Cell* **70**, 715–728
32. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., and Parton, R. G. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 913–924
33. van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992) *Cell* **70**, 729–740
34. Rosenfeld, J. L., Knoll, B. J., and Moore, R. H. (2002) *Receptors Channels* **8**, 87–97
35. Seachrist, J. L., and Ferguson, S. S. (2003) *Life Sci.* **74**, 225–235
36. Seachrist, J. L., Laporte, S. A., Dale, L. B., Babwah, A. V., Caron, M. G., Anborgh, P. H., and Ferguson, S. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 679–685
37. Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 901–914
38. Lippincott-Schwartz, J., and Smith, C. L. (1997) *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 631–639
39. Daly, C. J., and McGrath, J. C. (2003) *Pharmacol. Ther.* **100**, 101–118
40. Kallal, L., and Benovic, J. L. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 175–180
41. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 887–895
42. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13727–13736
43. Cao, T. T., Mays, R. W., and von Zastrow, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24592–24602
44. Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P. J., Tran, T., Brass, L. F., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M. A., Wells, T. N., Hoxie, J. A., and Marsh, M. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 651–664
45. Roseberry, A. G., and Hosey, M. M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33671–33676
46. Shapiro, M. J., Trejo, J., Zeng, D., and Coughlin, S. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32874–32880
47. Fraile-Ramos, A., Kledal, T. N., Pelchen-Matthews, A., Bowers, K., Schwartz, T. W., and Marsh, M. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 1737–1749
48. Wilbanks, A. M., Laporte, S. A., Bohn, L. M., Barak, L. S., and Caron, M. G. (2002) *Biochemistry* **41**, 11981–11989
49. Stevens, P. A., Bevan, N., Rees, S., and Milligan, G. (2000) *Mol. Pharmacol.* **58**, 438–448
50. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Bhalla, S., Laperriere, A., Morello, J. P., and Bouvier, M. (2002) *EMBO J.* **21**, 1628–1637
51. Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C. R., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2000) *Nature* **408**, 860–864
52. Nijenhuis, W. A., Oosterom, J., and Adan, R. A. (2001) *Mol. Endocrinol.* **15**, 164–171
53. Haskell-Luevano, C., and Monck, E. K. (2001) *Regul. Pept.* **99**, 1–7

1.4 Discussion

1.4.1 Principaux résultats

Nous avons démontré que l'activité constitutive du récepteur CB1 provoque un cycle constitutif d'endocytose et de recyclage du récepteur. Le récepteur est continuellement retiré de la membrane plasmique par endocytose, traverse les compartiments endosomaux, puis est recyclé à la membrane. L'équilibre qui s'établit entre endocytose et recyclage entraîne une distribution majoritairement intracellulaire de CB1, avec environ 15 % des récepteurs présents à la membrane plasmique. Les ligands de CB1, en modifiant l'état d'activité du récepteur, modulent cet équilibre : les agonistes favorisent la conformation active du récepteur et internalisent sa population membranaire, tandis que les agonistes inverses externalisent les récepteurs CB1 intracellulaires en favorisant la conformation inactive, bloquant l'endocytose constitutive sans modifier le recyclage constitutif. Ce cycle de trafic constitutif fait intervenir les voies de transport intracellulaires classiques dépendant des GTPases Rab : l'endocytose dépend de Rab5, tandis que le recyclage dépend de Rab4, mais pas de Rab11 (**Figure 20**).

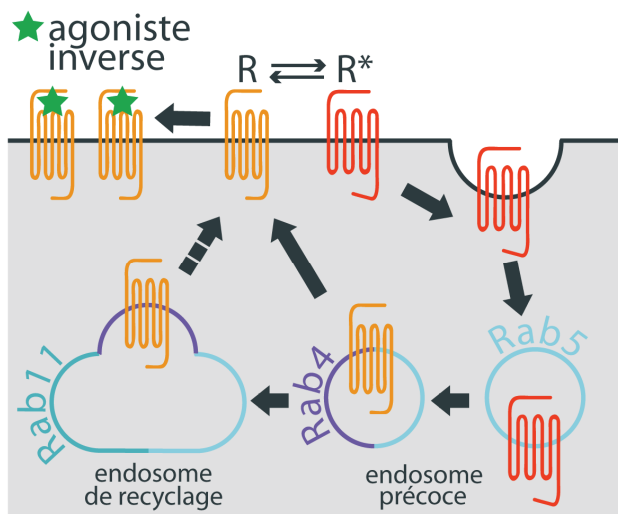


Figure 20 : Cycle constitutif d'endocytose/recyclage du récepteur CB1

Le récepteur CB1 est constitutivement actif à la membrane des cellules HEK-293, pouvant spontanément adopter la conformation active R* (en haut, en rouge). Ceci déclenche son endocytose constitutive par l'intermédiaire de puits recouverts de clathrine et d'une voie dépendante de Rab5 (à droite). Le récepteur est ensuite recyclé lentement (1 à 2h) vers la membrane plasmique par une voie dépendante de Rab4, voie qui évite le cœur des endosomes de recyclage (en bas à gauche). L'agoniste inverse (étoile verte) stabilise les récepteurs dans la conformation inactive R (en jaune), provoquant une accumulation progressive des récepteurs recyclés à la membrane plasmique (en haut à gauche). D'après Leterrier et al., 2004.

1.4.2 Mécanisme d'endocytose et trafic intracellulaire

Nous avons étudié le trafic intracellulaire constitutif du récepteur CB1, en caractérisant les étapes et les partenaires de ce trafic. Concernant l'endocytose du récepteur proprement dite, l'inhibition de l'endocytose par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), qui retire le cholestérol des membranes cellulaires, est un indice d'une endocytose médiée par une voie dépendante de la

clathrine. En effet, étant données la concentration et la durée d'incubation concernées (10 mM pendant une heure) la M β CD empêche l'endocytose par voie clathrine dépendante (Subtil et al., 1999), mais inhibe moins l'endocytose de la ricine, marqueur général de la membrane plasmique qui est internalisé par une voie indépendante de la clathrine (Rodal et al., 1999). De plus, la déplétion du cholestérol par la M β CD inhibe l'endocytose du récepteur à l'acide lysophosphatidique LPA1, l'un des RCPG les plus proches de CB1 en termes d'homologie de séquence, et cette endocytose de LPA1 est dépendante des β -arrestines et de la clathrine (Urs et al., 2005). En ce qui concerne la cinétique d'effet de la M β CD, l'agoniste inverse atteint son effet d'externalisation maximal au bout de deux heures, tandis que la M β CD agit rapidement avec un effet maximum atteint dès 30 minutes. Ceci indique que l'inhibition de l'endocytose du récepteur CB1 par l'agoniste inverse est moins efficace que celle obtenue par la M β CD, ou bien que la M β CD possède, outre son effet bloquant sur l'endocytose un effet supplémentaire d'accélération du recyclage. A ce sujet, il est intéressant de noter que la déplétion du cholestérol cellulaire accélère le recyclage du récepteur du folate. Cette protéine, dotée d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), est internalisée vers des endosomes contenant également le récepteur à la transferrine TfR, mais est recyclée beaucoup plus lentement que le TfR vers la membrane plasmique. Cependant, dans des cellules appauvries en cholestérol (cultivées en absence de lipoprotéines et en présence de mévalonate et de compactine), le récepteur du folate recycle avec la même cinétique que le récepteur TfR (Mayor et al., 1998), montrant un effet de la présence du cholestérol intracellulaire sur les voies de recyclage. Cependant, le retrait rapide du cholestérol par la M β CD est très différent de la diminution progressive du cholestérol membranaire lors de la culture en absence de lipoprotéines, et il semble que la M β CD séquestre spécifiquement le cholestérol présent dans la membrane plasmique (Neufeld et al., 1996; Hao et al., 2002). Ceci rend peu probable un effet de la M β CD sur les compartiments endosomaux et les voies de recyclage dans notre étude.

La ressemblance morphologique des compartiments endosomaux contenant CB1 avec les endosomes contenant la transferrine internalisée, ainsi que leur colocalisation partielle, sont des indices supplémentaires d'une voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Comme on le verra dans la seconde partie des résultats, les effets des dominants négatifs des protéines eps15 et dynamine ainsi que la colocalisation des récepteurs internalisés avec la clathrine fluorescente ont été observés dans les neurones et confirment que l'endocytose du récepteur est médiée par une voie dépendante de la clathrine, voie classique de l'endocytose des RCPG (Ferguson, 2001). Les premières étapes du trafic endocytique sont régulées par la GTPase Rab5, ce qui est également

commun à beaucoup de récepteurs (Seachrist and Ferguson, 2003), avec ici la particularité du caractère constitutif du trafic intracellulaire de CB1.

Le trajet des récepteurs lors du recyclage des endosomes de tri vers la membrane plasmique est plus ambigu. Tout d'abord, les inhibiteurs chimiques disponibles sont de nature variée (inhibiteur de l'acidification, de la PI3-Kinase, de l'activation de Arf1) et leur effet est souvent pléiotropique : il est techniquement difficile d'inhiber spécifiquement les voies de recyclage, sans doute à cause de leur diversité et du manque relatif de connaissances à leur sujet. L'utilisation des Rab4 et Rab11 mutantes permet une approche plus ciblée, qui agit sur des voies parallèles ramenant les récepteurs à la membrane plasmique. Néanmoins, depuis la publication de ce travail, une démonstration directe du recyclage des récepteurs CB1 a été obtenue, grâce à la mise au point du rinçage acide (*acid strip*) permettant de décrocher spécifiquement les anticorps liés à des récepteurs présents à la surface. Pour cela, nous avons utilisé une version modifiée de la fusion CB1-eGFP comportant un épitope FLAG au début de la queue aminoterminal : FCB1-eGFP (voir le Matériel & Méthodes de l'article 2). Nous pouvons donc marquer les récepteurs de surface avec l'anticorps anti-FLAG M1 ou avec l'anticorps anti-CB1 N-Ter. Cette double possibilité nous a d'abord permis de réaliser un triple marquage des récepteur CB1 internalisés (anti-FLAG M1 en *feeding* pendant une heure à 37 °C), en surface (N-Ter appliqué à 4 °C) et totaux (eGFP)(**Figure 21**). De plus, nous avons adapté le protocole de Fraile Ramos et ses collaborateurs, qui par *feeding* successifs avec l'anticorps primaire et secondaire suivis d'*acid strip*, permet de marquer sélectivement les récepteurs recyclés (Fraile-Ramos et al., 2001). Cette méthode marque les récepteurs CB1 présents à la membrane pendant l'incubation avec l'anticorps anti-FLAG M1, internalisés avant le premier *acid strip*, repassant à la membrane pendant l'incubation avec l'anti-souris fluorescent rouge, et réinternalisés avant le deuxième *acid strip*. Ceci correspond donc à des récepteurs CB1 ayant réalisé un minimum de un cycle et demi d'endocytose/recyclage pendant les deux heures trente que dure l'expérience : la présence de récepteurs intracellulaires étiquetés en rouge démontre directement le cycle d'endocytose/recyclage du récepteur CB1 (**Figure 21**).

La cinétique du recyclage et l'effet des Rabs impliquées méritent également quelques explications. D'un côté, la cinétique d'effet de l'agoniste inverse (déplétion maximale des compartiments intracellulaires au bout de deux heures) semble indiquer un cycle d'endocytose/recyclage lent pour le récepteur CB1, similaire à celui détecté pour le récepteur au thromboxane A2 TP β (Parent et al., 2001), le récepteur muscarinique M2 (Roseberry and Hosey, 1999) et le récepteur à la galanine GR2 (Xia et al., 2004). Cet intervalle est bien supérieur à la dizaine de minutes nécessaire pour le cycle rapide du récepteur TfR ou du récepteur β_2 AR en présence d'agoniste (Morrison et al., 1996). D'un autre côté, le recyclage du récepteur fait

intervenir la GTPase Rab4, mise en évidence le long des voies de recyclage rapide depuis les endosomes de tri, mais pas la GTPase Rab11, qui dirige le recyclage depuis les endosomes de recyclage périnucléaires. Ceci le rapproche du récepteur β_2 AR dont le recyclage est médié en partie par Rab4 (Seachrist et al., 2000) tandis que les récepteurs comme le récepteur à la vasopressine V2 (Innamorati et al., 2001), le récepteur à la somatostatine SSTR3 (Kreuzer et al., 2001) ou le récepteur aux chemokines CXCR2 (Fan et al., 2003) empruntent des voies de recyclage dépendantes de Rab11. De plus, le récepteur colocalise bien avec Rab4 mais ne présente pas d'accumulation périnucléaire, lieu où colocalisent Rab11 et le TfR (voir la **Figure 6 de l'article 1**). Il semble donc que le récepteur CB1 emprunte une voie de recyclage qui, bien que lente, ne passe pas par le cœur du compartiment endosomal de recyclage et dépend de Rab4. Il est possible que le récepteur soit retenu dans les parties tubulaires des endosomes de tri avant son recyclage vers la membrane plasmique, ou bien qu'il transite par les parties périphériques des endosomes de recyclage, d'où partent également des voies dépendantes de Rab4 (Sonnichsen et al., 2000).

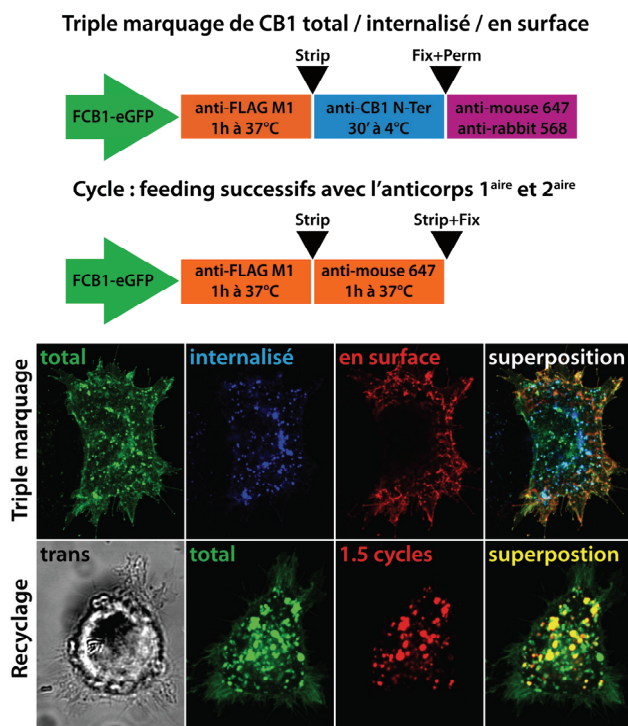


Figure 21 : Visualisation directe du cycle endocytaire

La mise au point du rinçage acide (*acid strip*) permet le marquage différentiel de différentes populations de récepteurs.

En haut est représentée la méthode de triple marquage (en haut) permettant de visualiser simultanément les récepteurs CB1 totaux (en vert), internalisés pendant une heure (en bleu), et présents à la surface (en rouge).

En bas, la méthode de *feeding/acid strip* successifs permettant de visualiser les récepteurs totaux (en vert) et les récepteurs ayant réalisé un cycle et demi (endocytose/recyclage/endocytose, en rouge).

1.4.3 Cycle de trafic d'un RCPG constitutivement actif

Nos résultats constituent la première étude précise du trafic intracellulaire consécutif à l'activité constitutive d'un RCPG sauvage. La modulation de la population membranaire des récepteurs CB1 après traitement par un agoniste ou un agoniste inverse avait été observée par Rinaldi-Carmona et ses collaborateurs (Rinaldi-Carmona et al., 1998) qui l'avaient interprétée dans

un cadre pharmacologique, le trafic cellulaire sous-jacent restant hypothétique. Nous avons caractérisé et détaillé ce trafic, montrant que l'agoniste inverse produit une externalisation par un mécanisme préalablement décrit pour des récepteurs mutants constitutivement actifs du récepteur AT_{1A} (Miserey-Lenkei et al., 2002). De plus, nous avons montré que le trafic intracellulaire du récepteur après son activation dépend de Rab5 et Rab4, mais pas de Rab11, et cela constitue la première description moléculaire d'un RCPG engagé dans cycle d'endocytose/recyclage constitutif. En effet, les études du trafic intracellulaire des RCPG étaient jusqu'alors restreintes aux événements suivant l'activation par un agoniste du récepteur, sans prendre en compte la possibilité d'une activité constitutive (Rosenfeld et al., 2002).

Ce travail s'inscrit néanmoins dans une progression constante des connaissances sur le trafic intracellulaire des RCPG. Partant de la connaissance du mécanisme d'endocytose des RCPG suite à leur activation par des agonistes, l'endocytose spontanée en absence de ligand a été caractérisée pour plusieurs récepteurs, en utilisant les techniques de biochimie classiques (*binding* et biotinylation de surface) et l'examen de la localisation subcellulaire. Ces études ont démontré l'endocytose spontanée du récepteur activé par la thrombine PAR1 (Shapiro et al., 1996), du récepteur à la cholecystokinine CCKA (Tarasova et al., 1997), des récepteurs aux chemokines CCR5 et CXCR4 (corécepteurs utilisés par le virus du VIH pour l'entrée dans la cellule) (Signoret et al., 1997; Signoret et al., 2000), des récepteurs à la vasopressine V2a et V1a (Innamorati et al., 2001), des récepteurs métabotropiques au glutamate mGluR1a (Dale et al., 2001) et mGluR5 (Fourgeaud et al., 2003). Ces études n'abordaient toutefois pas la possibilité d'un recyclage constitutif du récepteur, donc d'un cycle permanent entre la membrane plasmique et les endosomes.

Un cas particulier de cycle constitutif d'endocytose et de recyclage pour un R7TM concerne les récepteurs viraux, qui sont proches des récepteurs chemokine et dont l'expression est induite par les virus suite à l'infection de la cellule. Ces récepteurs n'ont pas à proprement parler de ligand, sont constitutivement actifs, et activent des voies de signalisation favorisant la synthèse et la multiplication du virus (Rosenkilde, 2005). Ils sont spontanément internalisés et recyclés, comme cela a été démontré pour US28 codé par le cytomégalovirus humain (Fraile-Ramos et al., 2001). Par ailleurs, des exemples de RCPG mammifères possédant un cycle constitutif (endocytose + recyclage) ont été rapportés dans la littérature : les études suivant la démonstration de l'endocytose constitutive de PAR1 ont démontré son recyclage constitutif (Shapiro and Coughlin, 1998). Le récepteur au thromboxane A₂ TPβ possède un cycle constitutif d'endocytose et de recyclage (Parent et al., 2001), et ce cycle dépend de Rab11 (Therriault et al., 2004). Le récepteur à la calcitonine CTR cycle constitutivement et son recyclage est dépendant de la filamine (Seck et al., 2003). Le récepteur muscarinique M2 (Roseberry and Hosey, 1999), le récepteur à la thyrotropine

TSHR (Baratti-Elbaz et al., 1999), et le récepteur à la galanine GR2 (Xia et al., 2004) sont tous susceptibles d'être constitutivement internalisés et recyclés, mais ce phénomène est présenté comme un mécanisme lent et minoritaire, conservant la plus grande partie des récepteurs à la membrane plasmique.

Cependant ces travaux, qui s'inscrivent dans des problématiques de biologie cellulaire, abordent rarement le lien entre la présence d'un cycle constitutif d'endocytose/recyclage et l'activité constitutive du récepteur. C'est l'originalité de notre travail qui démontre le lien fort existant entre l'état d'activation du récepteur et son trafic intracellulaire. Ceci est basé sur la modulation du cycle endocytique par les agonistes inverses qui inhibent l'activité constitutive du récepteur. Deux autres études menées parallèlement à nos travaux ont simultanément démontré la présence d'un cycle constitutif d'endocytose/recyclage de RCPG constitutivement actifs. Le récepteur métabotropique au glutamate mGluR1a possède une activité constitutive importante (Prezeau et al., 1996), qui peut être inhibée par les agonistes inverses LY367385 et BAY36-7620 (Pula et al., 2004) (**Figure 22A**). Le récepteur mGluR1b est un variant d'épissage alternatif qui possède une queue carboxyterminale plus courte et ne présente pas d'activité constitutive. Exprimé dans les cellules HEK-293, mGluR1a est majoritairement intracellulaire et mGluR1b est localisé surtout à la membrane plasmique. L'activité constitutive de mGluR1a provoque son endocytose constitutive, et les agonistes inverses externalisent mGluR1a à la membrane plasmique avec un effet maximal à 1h (Pula et al., 2004) (**Figure 22A**). Ceci constitue un second exemple de récepteur dont l'activité provoque un cycle d'endocytose/recyclage modulable par les agonistes inverses. Le deuxième autre exemple d'un tel comportement est représenté par le récepteur à la sérotonine 5-HT_{2C} (Marion et al., 2004). Ce récepteur existe sous de multiples formes dépendantes d'une édition de l'ARN qui provoque une mutation des acides aminés aux positions 156, 158 et 160. Le récepteur non édité (INI) est constitutivement actif à 100 %, tandis que le récepteur semi-édité (VSV) est constitutivement actif à 50 % et que le récepteur totalement édité (VGV) présente une activité constitutive négligeable (Niswender et al., 1999; Berg et al., 2001) (**Figure 22B**). Cette gradation des activités constitutives est corrélée avec leur localisation subcellulaire, le récepteur INI étant majoritairement intracellulaire alors que le VSV et le VGV sont plus membranaires. L'équipe de Marc Caron a démontré que l'activité constitutive du récepteur était responsable de la phosphorylation des récepteurs par GRK2, du recrutement constitutif des β -arrestines et de l'internalisation constitutive des récepteurs. L'agoniste inverse SB206553 est capable d'externaliser les récepteurs dans le cas des variants constitutivement actifs (Marion et al., 2004) (**Figure 22B**).

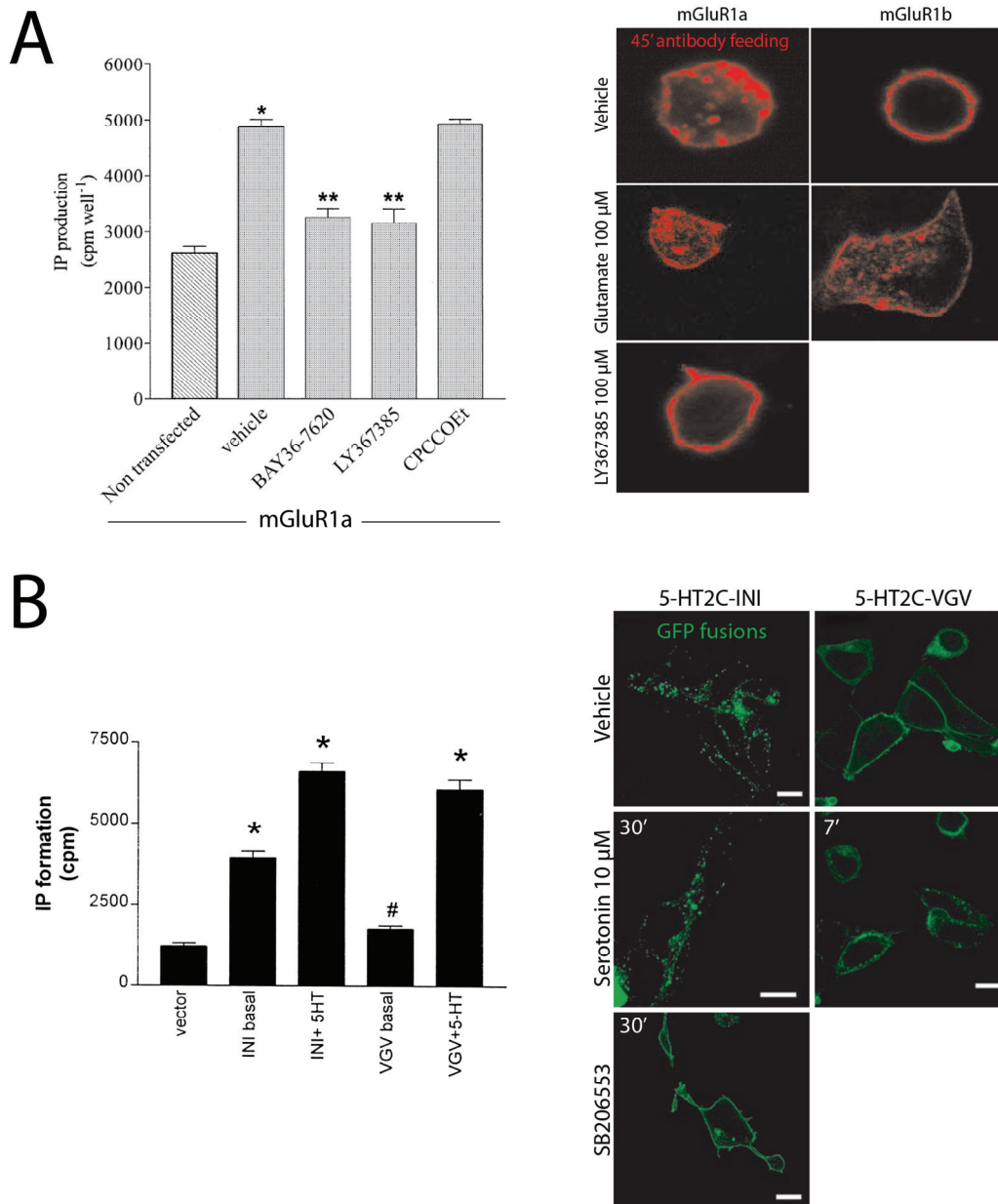


Figure 22 : Cycles endocytiques de RCPG constitutivement actifs

A/ Récepteur métabotrope au glutamate mGluR1A. L'activation constitutive du récepteur provoque une accumulation d'IP₃ dans les cellules HEK-293 transfectées, augmentation inhibée par les agonistes inverse BAY36-720 et LY397385 mais pas par l'antagoniste neutre CPCCOEt (à gauche). Le récepteur est constitutivement internalisé en l'absence de ligand (panel de gauche, en haut), et ceci est bloqué par l'agoniste inverse LY367385 (panel de gauche, en bas). L'isoforme mGluR1b, qui n'est pas constitutivement actif, n'est pas internalisé en absence de ligand (panel de droite, en haut), mais s'internalise après traitement par le glutamate (panel de droite, en bas). D'après Pula et al., 2004.

B/ Récepteur à la sérotonine 5-HT_{2C}. Le récepteur présente une édition post-transcriptionnelle, pouvant exister sous forme non éditée (INI) et sous forme totalement éditée (VGV). La forme INI est constitutivement active, stimulant la production d'IP₃ dans les cellules HEK-293, tandis que la forme VGV ne possède pas d'activité constitutive (à gauche). Le récepteur 5-HT_{2C}-INI est majoritairement intracellulaire (panel de gauche, en haut) et est externalisé par l'agoniste inverse (panel de gauche, en bas), contrairement au 5-HT_{2C}-VGV qui est membranaire en condition contrôle et s'internalise sous l'effet de la sérotonine (panel de droite). D'après Marion et al., 2004.

Quel est la pertinence de ces résultats ? Concernant le cycle constitutif d'endocytose et de recyclage, le grand nombre de récepteurs possédant cette caractéristique montre que la cellule utilise abondamment ce mécanisme pour réguler le nombre de récepteurs présents à la membrane plasmique (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). Concernant le lien entre ce cycle constitutif et l'activité constitutive du récepteur, nos travaux ainsi que ceux de Marion et al (Marion et al., 2004) indiquent que les deux événements sont liés et qu'une corrélation existe entre l'importance de l'activité constitutive et la proportion de récepteurs présents dans les différentes étapes du cycle. Cependant, d'autres travaux indiquent un lien moins marqué entre l'activité constitutive et le cycle d'endocytose/recyclage. Le récepteur α_{1A} adrénergique possède une activité constitutive et cycle constitutivement dans les cellules fibroblastes Rat-1. L'incubation des cellules avec un agoniste inverse, la prazosine, est capable d'externaliser seulement une minorité des récepteurs $\alpha_{1A}AR$, entraînant une augmentation de la population membranaire d'environ 20 % (Morris et al., 2004). Peut-être s'agit-il d'un comportement agoniste inverse partiel de la prazosine dans ce système. Il est intéressant de noter que la prazosine est capable d'externaliser un autre sous-type constitutivement actif du récepteur α_1 adrénergique, $\alpha_{1D}AR$ (McCune et al., 2000). Plus troublant, le récepteur métabotropique au glutamate mGluR5 est endocyté constitutivement dans les cellules COS et les neurones d'hippocampe en culture (Fourgeaud et al., 2003). Cette endocytose ne dépend pas de l'état d'activation du récepteur, car elle n'est modifiée ni par la présence de l'agoniste inverse MPEP, ni par l'introduction de mutations rendant le récepteur insensible au glutamate. Si ces résultats sont confirmés par d'autres études, cela signifierait que l'activité constitutive d'un récepteur n'est pas toujours nécessaire à son endocytose constitutive. Néanmoins, l'effet des agonistes inverses d'inhibition de l'endocytose constitutive a été largement corroboré par des études sur de nombreux récepteurs, mutants ou sauvages. Ceci inclut l'uprégulation de récepteurs constitutivement actifs après traitement à long terme par l'agoniste inverse (Milligan and Bond, 1997) ainsi que les observations d'externalisation après traitement à court terme (Parnot et al., 2002).

1.4.4 Le cycle endocytique comme modulateur de la présence à la membrane

De nombreuses molécules ont la capacité de cycliser constitutivement entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux. Ces protéines peuvent être des récepteurs permettant l'approvisionnement de la cellule en éléments extérieurs comme le fer (récepteur à la transferrine TfR) ou le cholestérol (récepteur à la *Low Density Lipoprotein* LDLR) (Maxfield and McGraw,

2004). Ces récepteurs ont été extensivement étudiés et ont servi de base à la connaissance des voies d'endocytose et de trafic intracellulaire, établissant les notions d'endocytose médiée par la clathrine et l'anatomie des compartiments endosomaux. D'autres protéines possèdent un cycle d'endocytose/recyclage comme les pompes à protons (H^+ -ATPase) impliquées dans la sécrétion des sucs gastriques dans l'appareil digestif (Okamoto and Forte, 2001), les canaux aquaporines AQP2 qui régulent le passage de l'eau dans les reins (Katsura et al., 1995), ou le transporteur du glucose GLUT4 dans les cellules musculaires et adipeuses (Dugani and Klip, 2005). Ce qu'il est important de souligner, au-delà de la disparité de ces exemples, c'est le modèle général d'un cycle de trafic intracellulaire constitutif permettant à la cellule de moduler le nombre de protéines fonctionnelles à sa surface en réponse à différents modulateurs. Ces modulateurs peuvent être le sécrétagogue dans le cas des pompes à proton, la vasopressine dans le cas des aquaporines, l'insuline pour le transporteur du glucose (Royle and Murrell-Lagnado, 2003), ou les ligands dans le cas de récepteurs (Milligan and Bond, 1997). Nous allons présenter deux exemples de cycles régulés présents dans le système nerveux : le cycle des récepteurs AMPA et $GABA_A$ qui jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique, et le cycle du transporteur de la dopamine DAT qui est impliqué dans certains mécanismes addictifs.

Les synapses neuronales comportent, au niveau postsynaptique, des récepteurs aux neurotransmetteurs : AMPA et NMDA, récepteurs du glutamate, au niveau des synapses excitatrices, et $GABA_A$, récepteurs du GABA, au niveau des synapses inhibitrices. Il est apparu qu'outre la modulation de la libération des neurotransmetteurs du côté présynaptique, la densité de récepteurs postsynaptiques pouvait varier, modulant la force de la synapse (Kittler and Moss, 2001). En particulier, la densité membranaire des récepteurs AMPA dépend d'un cycle d'endocytose/recyclage (Luscher et al., 2000). L'endocytose est médiée par la clathrine et la dynamine (Carroll et al., 1999), et le cycle est modulé par la présence des ligands des récepteurs, et donc par l'activité synaptique. Au niveau moléculaire, les mécanismes de régulation de la transmission synaptique et de la mémoire que sont la *Long Term Potentiation* (LTP) (Park et al., 2004) et la *Long Term Depression* (LTD) (Linden, 2001) dépendent ainsi du cycle d'endocytose/recyclage constitutif du récepteur AMPA (Malinow and Malenka, 2002). Au niveau des synapses inhibitrices, les récepteurs $GABA_A$ présentent également un cycle d'endocytose/recyclage, et le nombre de récepteurs présents à la membrane plasmique module la potentiation de la transmission synaptique inhibitrice (Nusser et al., 1998). La densité de récepteurs $GABA_A$ en surface est augmentée par l'insuline et diminuée par le BDNF et les agonistes du récepteur (GABA ou benzodiazépines) (Kittler and Moss, 2001).

Les transporteurs sont des protéines membranaires qui assurent la recapture des neurotransmetteurs extracellulaires, permettant une resensibilisation des synapses. Des transporteurs existent pour tous les neurotransmetteurs classiques (glutamate, GABA, dopamine, norépinéphrine, sérotonine), et plusieurs cyclent constitutivement entre la membrane et les compartiments endosomaux : c'est le cas du GAT, le transporteur du GABA, et du DAT, le transporteur de la dopamine (Melikian, 2004). Le cycle peut être régulé par des facteurs intracellulaires (phosphorylations) ou par le neurotransmetteur transporté. En particulier, le DAT est internalisé par la dopamine et les amphétamines, tandis qu'il est externalisé par la cocaïne (Kahlig et al., 2004). Les variations des niveaux membranaires de DAT sont corrélées aux changements comportementaux induits par de telles drogues psychostimulantes, et la régulation du cycle d'endocytose/recyclage du DAT est donc un point de départ moléculaire crucial pour l'élucidation des effets de ces drogues (Zahniser and Sorkin, 2004).

On a donc pu voir pour ces deux exemples, la régulation des récepteurs synaptiques AMPA et GABA_A ainsi que celle du transporteur à la dopamine DAT, l'intérêt d'un cycle constitutif d'endocytose et de recyclage. L'on pourrait objecter que le coût énergétique de l'entretien permanent d'un tel trafic intracellulaire est prohibitif (par exemple d'hydrolyse constante du GTP par les différentes GTPases impliquées). Ce coût est cependant compensé par la possibilité de moduler rapidement, sous l'effet de régulateurs extracellulaires (ligands) ou intracellulaires (phosphorylations), la densité de ces protéines à la membrane et donc la magnitude de leur effets fonctionnels. Un système statique qui devrait mettre en marche des régulations de type transcriptionnelles ne pourrait posséder une telle combinaison d'efficacité, de rapidité et de sensibilité (Royle and Murrell-Lagnado, 2003). La présence d'un tel cycle constitutif pour le récepteur CB1, coûteux en énergie, semble donc témoigner d'un rôle important de ce récepteur dans le fonctionnement cellulaire. Or ce rôle s'exerce dans le cadre d'une cellule très particulière, le neurone : il apparait dès lors nécessaire de vérifier la pertinence physiologique de nos travaux dans le cadre de cellules neuronales. Comme on le verra dans la deuxième partie des résultats, nous avons constaté que ce cycle d'endocytose/recyclage dépendant de l'activité constitutive est présent dans les neurones. Plus encore, les conséquences de ce cycle en termes de localisation cellulaire nous amène à proposer un rôle biologique nouveau pour l'activité constitutive du récepteur CB1 en particulier, et des récepteurs axonaux en général.

2 Activité constitutive et adressage axonal du récepteur CB1

2.1 Introduction : polarité et trafic neuronal

2.1.1 Les neurones : cellules polarisées

Les neurones sont « le summum de la spécialisation cellulaire » (Horton and Ehlers, 2003): cette spécialisation morphologique et fonctionnelle permet d'assurer la détection, la transmission et le stockage de l'information indispensable aux organismes complexes. Le niveau le plus général de cette polarisation est la séparation entre le compartiment axonal, où se propagent les potentiels d'action et où s'organisent les terminaisons présynaptiques libérant les neurotransmetteurs, et le compartiment somatodendritique, où sont présentes les spécialisations postsynaptiques qui intègrent les signaux envoyés par les neurones afférents (Craig and Banker, 1994). À l'intérieur de chacun de ces compartiments, des spécialisations supplémentaires sont présentes : épines dans les dendrites, nœuds de Ranvier et terminaisons présynaptiques dans les axones. Les mécanismes permettant la génération et la maintenance de la polarité neuronale ont été l'objet d'intenses recherches. La mise au point de méthodes de cultures neuronales, permettant l'observation de la polarisation à l'échelle de neurones uniques, a permis de discerner les facteurs extrinsèques et intrinsèques régulant ce processus. La plus utilisée de ces méthodes est sans nul doute la culture de neurones embryonnaires d'hippocampe de rat, établie à la fin des années 1970 par Gary Banker et ses collaborateurs (Banker and Cowan, 1977). Je présenterai ce modèle d'étude avant de revenir sur les mécanismes permettant la polarisation et la maintenance de compartiments différenciés, en particulier les différents modes d'adressage des protéines membranaires axonales.

2.1.2 La culture de neurones embryonnaires d'hippocampe de rat

La biologie cellulaire exploite intensivement le modèle des cellules en culture, le plus souvent sous la forme de lignées établies, cellules « immortelles » se divisant à l'infini, par exemple les cellules HEK-293 utilisées dans la première partie de ce travail. Cependant, l'étude du fonctionnement du système nerveux implique de posséder des cultures cellulaires présentant un phénotype neuronal. Or, il n'existe pas de lignées cellulaires comportant l'ensemble des caractéristiques des neurones du système nerveux central, à savoir l'expression spécifique d'un ensemble de protéines (récepteurs, canaux ioniques, neurotransmetteurs et transporteurs), la présence de compartiments axonaux et somatodendritiques différenciés ou encore l'établissement de synapses fonctionnelles. Parmi les lignées s'approchant de phénotypes neuronaux se trouve la

lignée de cellules PC12, isolée en 1976 à partir d'une tumeur phéochromocytome de rat (Greene and Tischler, 1976). Cette lignée permet d'obtenir, après différenciation en présence de *Neuronal Growth Factor* (NGF), des cellules ressemblant à des neurones périphériques, mais ces cellules ne forment pas de synapses et ne présentent pas de polarité somatodendritique/axonale. D'autres lignées permettent de s'approcher encore davantage de phénotypes neuronaux comme la lignée P19 dérivée d'une tumeur de souris (Jones-Villeneuve et al., 1982), dont on peut induire la différenciation neuronale (Staines et al., 1994), ou encore les cellules N-Tera 2 (Pleasure et al., 1992). Cependant, les processus de différenciation de ces lignées sont longs, similaires à la vitesse de croissance de cultures primaires de neurones, ce qui diminue leur utilité.

La culture primaire de neurones dissociés reste donc une méthode de choix pour accéder au neurone en tant que cellule individuelle, observable lorsqu'elle est vivante ou fixée. Nous avons choisi la culture de neurones d'hippocampe de rat car elle compte parmi les mieux caractérisées et les plus utilisées (**Figure 23**). Elle consiste à prélever l'hippocampe sur des cerveaux d'embryons de rats à un âge embryonnaire compris entre E17 et E19, à dissocier la population de neurones qui sont ensuite déposés à basse densité (100-500 cellules/mm²) sur des lamelles recouvertes de protéines d'adhésion comme la polylysine (Banker and Cowan, 1977).

Le développement de ces neurones semble récapituler la différenciation neuronale à l'œuvre *in vivo*, tant d'un point de vue morphologique (Bartlett and Banker, 1984b, 1984a) que génomique (Dabrowski et al., 2003). Les étapes stéréotypées du développement ont été décrites (Dotti et al., 1988) (**Figure 23**) : partant d'une morphologie sphérique au moment du dépôt, les neurones émettent des lamellipodes (stade 1) qui en quelques heures se transforment en neurites (stade 2). Au bout de 24 à 48h, l'une de ces neurites se met à pousser plus vite et sa différenciation en axone est déclenchée tandis que la croissance des autres neurites s'interrompt (stade 3). Au bout de quatre jours, ces neurites secondaires recommencent à pousser et se différencient en dendrites (stade 4) (**Figure 23A et 23D**). Au bout d'une semaine, la polarisation est complète (stade 5), les marqueurs des compartiments somatodendritiques (MAP2) et axonaux (Tau) sont polarisés (**Figure 23B**), les neurones s'interconnectent (**Figure 23C**) et les synapses se mettent en place (**Figure 23E**). La maturation se poursuit durant les deuxième et troisième semaines de culture avec la croissance des dendrites, l'apparition d'épines et l'établissement d'une arborisation axonale et d'une connectivité de plus en plus importante (Bartlett and Banker, 1984a). Il est important de noter que ces neurones forment des synapses fonctionnelles (Segal, 1983) qui peuvent être GABAergiques ou glutamatergiques (Craig et al., 1994).

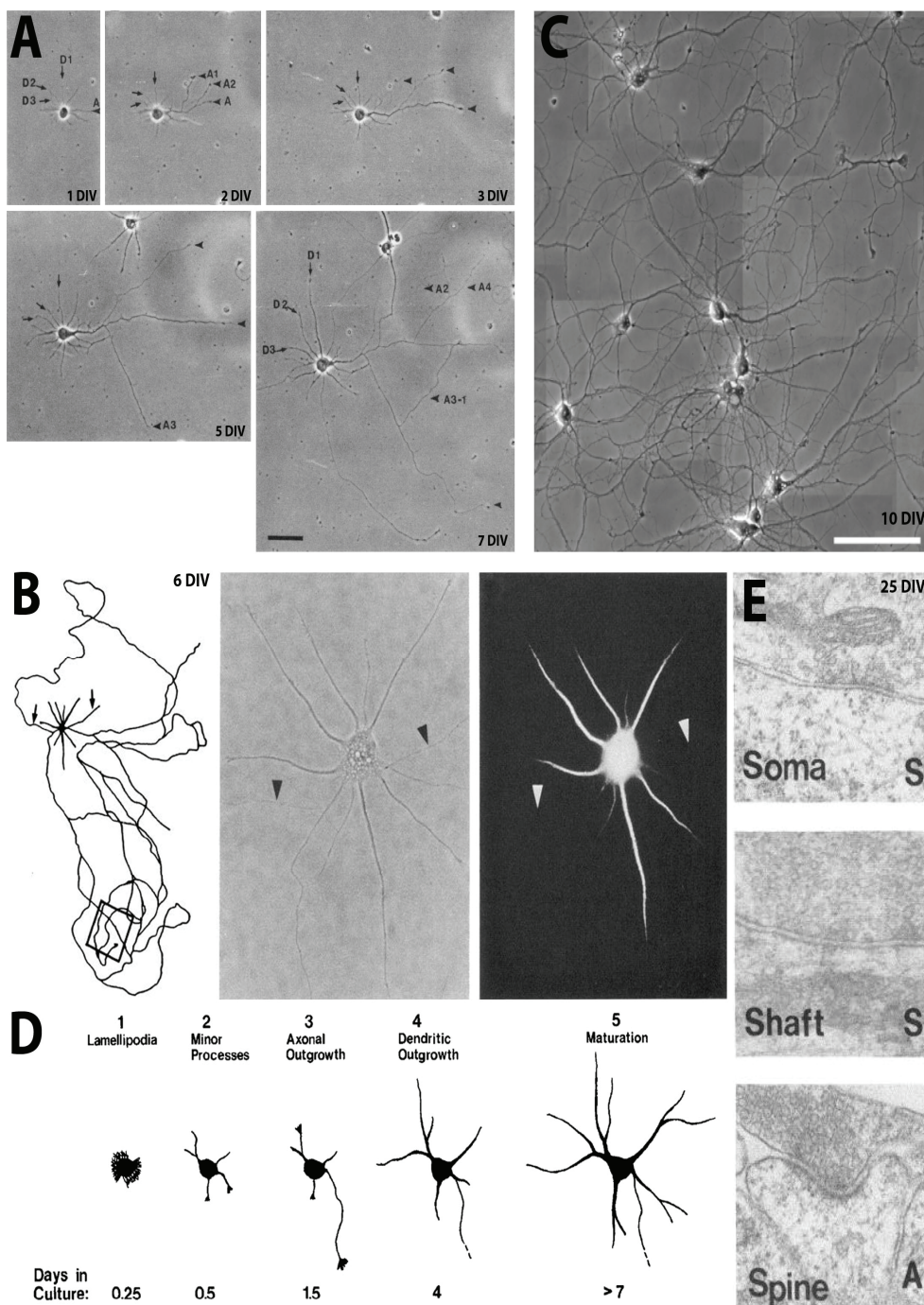


Figure 23 : Neurones d'hippocampe en culture

L'hippocampe est prélevé sur des cerveaux d'embryons de rat à 18 jours embryonnaires (E18). Après dissociation, les neurones sont déposés à faible densité sur des lamelles recouvertes de polylysine et mis en présence de cultures de cellules gliales au sein d'un milieu chimiquement défini.

A/ Développement d'un neurone après 1, 2, 3, 5 et 7 jours en culture (*Days In Vitro* DIV). Le futur axone (A) est indistinguable des futures dendrites (D1, D2, D3) à 1 DIV, mais a déjà poussé considérablement à 2 DIV et a développé des branchements (A1, A2, A3). A partir de 3 DIV, les dendrites poussent également (D1, D2, D3). D'après Dotti et al., 1988.

B/ Neurone entièrement isolé à 6 DIV, montrant l'étendue de l'arborisation axonale (à gauche) ainsi que de longues dendrites positives pour MAP2 (têtes de flèches, à droite). D'après Fletcher et al., 1991.

C/ Réseau neuronal connecté après 10 DIV. C'est à ce stade (8 à 11 DIV) et à cette densité de neurones (200-300/mm²) qu'on été réalisées nos expériences sur le trafic de CB1. D'après Sampo et al., 2003.

D/ Schéma récapitulatif des 5 stades de la différenciation neuronale *in vitro* et les événements morphologiques associés (au dessus des dessins), avec la durée de culture correspondante moyenne (en dessous). D'après Dotti et al., 1988.

E/ Neurones pleinement matures à 25 DIV possédant des synapses différenciées et fonctionnelles, à la fois sur le corps cellulaire (*soma*), le fût dendritique (*shaft*) ou aux extrémités d'épines dendritiques (*spine*). D'après Bartlett and Banker, 1984.

Les neurones présents dans la culture sont principalement des neurones présentant un phénotype pyramidal glutamatergique, ainsi qu'une minorité (environ 6 %) d'interneurones GABAergiques inhibiteurs (Benson et al., 1994). La plupart de ces neurones GABAergiques expriment le récepteur CB1 (Irving et al., 2000), situation comparable à la distribution *in vivo*, où l'expression de CB1 dans l'hippocampe est le fait d'une sous-population des interneurones GABAergique (Katona et al., 1999). Ceci nous a permis d'étudier le trafic des récepteurs CB1 exprimés de manière endogène par les neurones en culture. Nous avons également bénéficié des techniques mises au point pour la transfection de ces neurones, qui nous ont permis d'y exprimer des protéines fusion CB1-eGFP (Ohki et al., 2001).

2.1.3 Développement et maintien de la polarité neuronale

Les neurones en cultures présentent dès le troisième ou quatrième jour de culture (3-4 DIV) une polarisation morphologique entre un long axone enrichi en phosphoprotéine Tau et plusieurs dendrites plus courtes où est localisée la protéine MAP2. Comment un neurone de stade 2 possédant plusieurs neurites équivalentes va-t-il différencier l'une d'entre elle, qui va devenir l'axone, tandis que les autres deviennent des dendrites ? Ce phénomène est appelé « spécification de l'axone », car le développement de l'axone et sa différenciation prennent place avant la spécialisation des dendrites (Fukata et al., 2002). Un impressionnant ensemble de travaux a été réalisé pour établir les mécanismes dirigeant l'apparition de l'axone et la polarité neuronale (Craig and Banker, 1994), domaine progressant rapidement mais heureusement régulièrement récapitulé dans le détail (Arimura and Kaibuchi, 2005; Wiggin et al., 2005). Il semble que les signaux fournis par la matrice extracellulaire se répercutent sur la localisation de la ganglioside sialidase, qui se concentre dans l'une des neurites (le futur axone), ce qui augmente l'activité du récepteur tyrosine kinase TrkA dans cette neurite (Da Silva et al., 2005), provoquant une augmentation de l'activité PI3-Kinase et la production de phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphate PIP3 (Shi et al., 2003). PIP3 régule la kinase Akt, la glycogène synthase kinase GSK-3 β et la *Collapsin Response Mediating Protein* CRMP2, avec un effet sur le transport le long des microtubules et l'endocytose. Le lipide PIP3 régule également une voie comprenant les GTPases Rac1 et cdc42, ainsi que le complexe de polarité Par3/Par6/*atypical Protein Kinase C* (aPKC), qui régulent le cytosquelette d'actine (Arimura and Kaibuchi, 2005)(**Figure 24**). La découverte récente du rôle de la position du centrosome dans l'établissement de la polarité neuronale (de Anda et al., 2005) pourrait être la source ou la conséquence des activités de la PI3-Kinase et de cdc42.

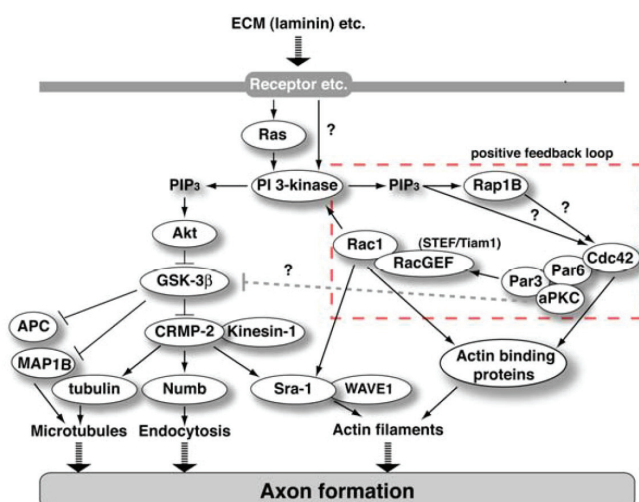


Figure 24 : Spécification de l'axone

Ce schéma résume les connaissances concernant le passage d'un neurone non polarisé, possédant des neurites équivalentes (stade 2) à un neurone possédant un axone différencié, et des neurites qui deviendront par la suite des dendrites (stade 3). Cette transition a lieu entre 24h et 48h après la mise en culture (1-2 DIV).

Le rôle central de la PI3-Kinase, point de départ de deux voies, l'une amenant la modulation des microtubules, l'autre celle des filaments d'actine, est souligné. D'après Arimura and Kaibuchi, 2005.

Une fois la polarité établie, c'est-à-dire les compartiments somatodendritique et axonal définis, le neurone doit maintenir une ségrégation moléculaire entre ces deux compartiments en permettant la localisation polarisée des protéines dans chacun des compartiments. En particulier, les compartiments portent à leur surface des protéines membranaires distinctes, reflétant les fonctions très différentes de l'axone et des dendrites. Plusieurs modèles ont été proposés et validés pour expliquer la distribution polarisée de protéines membranaires : expédition sélective (comprenant également le phénomène dit de pré-assemblage), transport sélectif, fusion sélective ou rétention sélective. Avant d'entrer dans le détail de ces modèles, précisons une comparaison qui a originellement orienté les premiers travaux sur la distribution polarisée des protéines à la surface neuronale : il s'agit de l'analogie entre les compartiments somatodendritique/axonal dans les neurones et les compartiments basolatéral/apical dans les cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales, qui s'assemblent en un réseau bidimensionnel pour former un épithélium, sont des cellules polarisées comportant un compartiment apical (au contact du lumen) et un compartiment basolatéral (entre les cellules et au contact de la lame basale). Les jonctions latérales, zones très denses et rigides, empêchent la diffusion des protéines membranaires entre les deux compartiments. Les cellules épithéliales possèdent un système d'export membranaire et des structures endosomales permettant l'insertion et le trafic sélectif des protéines à la membrane basolatérale ou apicale (Mostov et al., 2003). Les protéines peuvent également être adressées par transcytose, c'est-à-dire endocytose de la protéine depuis un compartiment suivi de recyclage vers l'autre compartiment. L'exemple typique est le récepteur de l'immunoglobuline polymérique pIgR qui est inséré dans la membrane basolatérale puis après liaison de son ligand IgA, est endocyté et recyclé vers la membrane apicale. Partant de la distribution de glycoprotéines exprimées dans les

cellules épithéliales et dans les neurones en culture, Carlos Dotti et Kai Simons ont proposé une analogie entre les compartiments somatodendritique et basolatéral d'une part, axonal et apical d'autre part (Dotti and Simons, 1990). La barrière de diffusion constituée par les jonctions cellulaires trouve son équivalent au niveau de l'embouchure de l'axone, zone riche en ancrages cytosquelettiques (par exemple les ankyrines) qui limitent la diffusion des protéines et de lipides au sein de la membrane plasmique entre les compartiments axonaux et somatodendritiques (Kobayashi et al., 1992; Winckler et al., 1999; Nakada et al., 2003). Cependant, si de nombreuses protéines exprimées à la surface basolatérale des cellules épithéliales sont effectivement exprimées dans le compartiment somatodendritique, les protéines à distribution apicale sont souvent exprimées indifféremment à la surface des dendrites et de l'axone (Jareb and Banker, 1998). À ces faits expérimentaux s'ajoute une contestation théorique de la métaphore épithéliale (Colman, 1999). Il semble donc que cette analogie, bien que valable dans ses grandes lignes, soit imparfaite, en particulier en ce qui concerne les protéines axonales (Winckler and Mellman, 1999).

2.1.4 Modes d'adressage des protéines membranaires

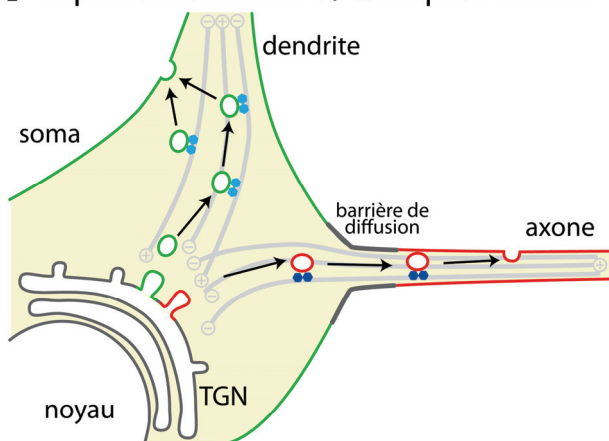
Cette analogie a cependant aidé à conceptualiser le trafic intracellulaire neuronal et les modes d'adressage des protéines membranaires vers leur compartiment de destination. Considérons le trafic intracellulaire d'une protéine membranaire : biosynthèse, export du TGN, transport, fusion membranaire, endocytose, recyclage, dégradation. On peut penser qu'une sélection peut intervenir à chacune de ces étapes et entraîner une expression de surface spécifique à un compartiment : ceci permet de dégager différents modèles d'adressage vers les compartiments axonal et somatodendritique (Winckler, 2004). Chacun de ces modes est basé sur une sélectivité des différentes étapes, et il est probable que le neurone utilise ces modes simultanément pour l'adressage de différentes protéines et parfois pour une même protéine (**Figure 25**).

Si la sélection a lieu à l'étape d'export hors du TGN, on parle d'expédition sélective (*selective delivery*). Après leur synthèse, les protéines membranaires présentes dans le TGN au niveau du soma sont incluses dans des vésicules de transport distinctes selon leur destination, somatodendritique ou axonale (**Figure 25A**). Expérimentalement, la présence de populations de vésicules contenant spécifiquement certaines protéines membranaires a été mise en évidence pour les protéines basolatérale et apicale dans les cellules épithéliales (Keller et al., 2001). Dans les neurones, les vésicules contenant le récepteur de la transferrine TfR somatodendritique sont distinctes de celles transportant la protéine d'adhésion NgCAM axonale (Burack et al., 2000). Les vésicules transportant les protéines destinées à l'axone peuvent transporter simultanément des protéines différentes, comme cela a été montré pour la protéine VAMP-2 (SNARE vésiculaire

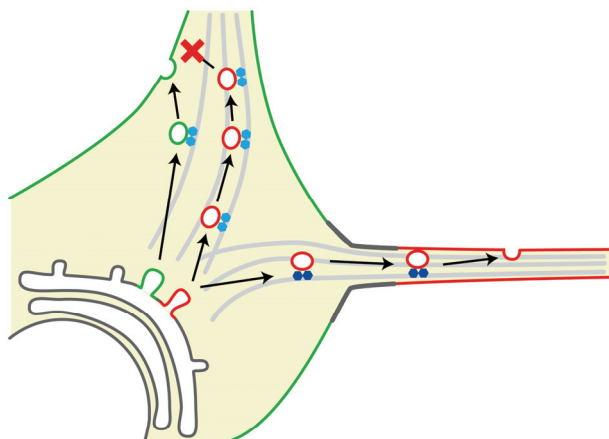
impliquée dans la libération de neurotransmetteurs), la protéine GAP43 (aussi appelée neuromoduline, protéine présynaptique impliquée dans la plasticité axonale) et la protéine APP (précurseur du peptide amyloïde) (Nakata and Hirokawa, 2003). Cependant, Carlos Dotti et ses collaborateurs ont observé des populations, différentes dans leur morphologie et leur cinétique, assurant le transport de l'APP et de la synaptophysine (aussi appelée p38, protéine présente dans les vésicules présynaptiques) (Kaether et al., 2000). Il paraît ici logique de séparer l'adressage des protéines axonales, c'est-à-dire présentes de manière uniforme le long de l'axone comme NgCAM, de celui des protéines présynaptiques, comme la synaptophysine, concentrées au niveau des terminaux. La présence de vésicules et de cinétiques de transport distinctes en témoigne, tout comme la découverte que les compartiments présynaptiques peuvent être transportés pré-assemblés depuis le TGN vers les terminaux (Ahmari et al., 2000).

La sélection menant à l'adressage préférentiel peut également se faire au niveau du transport des vésicules, amenant les protéines membranaires au contact de la membrane plasmique somatodendritique ou axonale. Dans les neurones, le transport intracellulaire se fait le long des microtubules, principalement par l'intermédiaire de moteurs protéiques, membres de la famille des kinésines (KIF). Or, dans les neurones, la polarité des microtubules est différente au niveau de l'axone et des dendrites : les microtubules axonaux orientent leur extrémité positive vers la partie distale de l'axone, tandis que les microtubules dendritiques orientent indifféremment leur bout positif ou négatif vers l'extrémité des dendrites (Baas et al., 1988; Baas et al., 1989). On peut ainsi imaginer qu'un moteur se dirigeant des bouts positifs vers les bouts négatifs des microtubules est capable de transporter sélectivement les vésicules vers les dendrites. Au contraire, un transport sélectif vers l'axone ne peut se faire simplement sur la base de l'orientation des microtubules, puisque les moteurs induisant un transport vers le bout positif des microtubules peuvent aller aussi bien vers les dendrites que vers l'axone. Il est intéressant de noter que dans les travaux de Burack et ses collaborateurs (Burack et al., 2000), les vésicules contenant le récepteur TfR somatodendritique ne pénètrent pas dans l'axone tandis que celles transportant NgCAM axonal sont présentes à la fois dans les dendrites et l'axone, indiquant que la sélectivité de la distribution axonale de NgCAM est assurée en aval du transport. Un transport spécifique vers l'axone implique une reconnaissance « intelligente » des microtubules par le moteur protéique (Setou et al., 2004). De fait, certaines KIF comme KIF5 semblent être capables de discerner les microtubules axonaux et somatodendritiques autrement que par leur polarité, et peuvent induire un transport sélectif vers l'axone (Hirokawa and Takemura, 2004).

A expédition sélective / transport sélectif



B fusion sélective



C endocytose sélective / rétention sélective

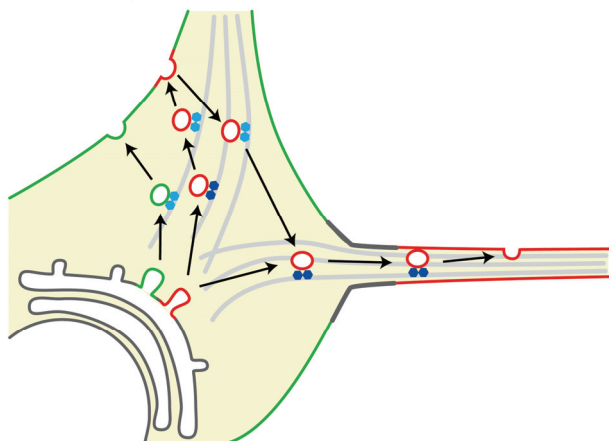


Figure 25 : Modèles d'adressage axonal

Sont figurés trois types de stratégies cellulaires visant à la distribution d'une protéine membranaire restreinte à la membrane axonale.

A/ Adressage direct: expédition et transport sélectifs.

Les protéines sont triées juste après la synthèse et sortent du TGN dans des vésicules distinctes (en vert et rouge), qui se dirigent grâce à un transport sélectif vers le compartiment somatodendritique ou axonal. Dans le cas du transport dendritique, la polarité des microtubules (en gris) permet une sélection basée sur la direction préférentielle des moteurs de type kinésines (en bleu).

B/ Fusion sélective

Les vésicules contenant les protéines axonales sortant du TGN (en rouge) ne sont pas dirigées sélectivement vers l'axone et partent également vers les dendrites, mais elles ne peuvent pas fusionner avec la membrane somatodendritique (croix rouge), entraînant une distribution restreinte à l'axone. C'est le cas des vésicules contenant NgCAM selon Burack et ses collaborateurs (Burack et al., 2000), tandis que les vésicules porteuses du récepteur Tfr sont directement dirigées dans le compartiment somatodendritique où elles fusionnent (en vert).

C/ Endocytose et rétention sélectives

Les protéines axonales sont susceptibles d'être exprimées indifféremment à la membrane somatodendritique ou axonale (en rouge), mais la protéine est sélectivement internalisée dans le soma et les dendrites, tandis qu'elle est maintenue à la membrane dans l'axone. C'est le cas de la protéine CD4-Na_v1.2 (Garrido et al., 2001), de la protéine

En aval du transport, des protéines adressées indifféremment vers les dendrites et l'axone peuvent fusionner seulement avec la membrane du compartiment cible : c'est la fusion sélective (*selective fusion*) (Figure 25B). Ce mode d'adressage a été proposé pour la protéine NgCAM, basé

sur la présence de vésicules contenant NgCAM dans le compartiment somatodendritique (Burack et al., 2000; Silverman et al., 2001) et l'absence de fusion de ces vésicules avec la surface somatodendritique (Sampo et al., 2003). Cependant, ce type d'adressage est délicat à caractériser expérimentalement, car il est particulièrement difficile à différencier des modèles de rétention sélective et de transcytose (voir ci-dessous). Au niveau des bases moléculaires soutenant un mécanisme de fusion sélective, on pourrait songer à des mécanismes de fusion vésiculaire différents selon les compartiments, notamment grâce à une sélectivité des protéines SNARE, qui pourraient permettre la fusion des vésicules seulement dans un compartiment. Exception faite des SNAREs spécifiques du cycle des vésicules synaptiques, les SNARE impliquées dans le transport des protéines vers la surface neuronale comme TI-VAMP/VAMP-7 n'établissent cependant pas de distinction entre les dendrites et l'axone (Martinez-Arca et al., 2001).

Enfin, les protéines peuvent être envoyées et insérées dans les membranes somatodendritique et axonale, mais retirées par endocytose sélective dans l'un des deux compartiments. Un tel comportement a été démontré pour plusieurs protéines axonales qui apparaissent de manière transitoire à la membrane somatodendritique mais sont rapidement internalisées, et sont en revanche stables à la membrane axonale. Ce mécanisme est donc appelé endocytose sélective (*selective endocytosis*) ou rétention sélective (*selective retention*), selon l'importance donnée au phénomène observé dans les dendrites ou dans l'axone (**Figure 25C**). Les expériences d'*antibody feeding*, d'inhibition de l'endocytose par des protéines mutées ou encore de cinétique d'export après blocage par la bréfeldine A, que nous avons réalisées pour le récepteur CB1, ainsi que l'obtention de mutants déficients pour l'endocytose, sont les principaux outils démontrant l'endocytose constitutive à la membrane somatodendritique. Le premier exemple d'un tel mécanisme a été découvert par l'équipe de Bénédicte Dargent concernant le canal sodique $Na_v1.2$, qui s'accumule à la surface neuronale au niveau du segment initial de l'axone (Garrido et al., 2001). La recherche des déterminants de cet adressage a été entreprise grâce à une chimère de la protéine CD4 et de la queue carboxyterminale de $Na_v1.2$. Cette portion carboxyterminale contient un motif d'endocytose qui provoque l'endocytose constitutive de la chimère depuis le compartiment somatodendritique et établit la polarité axonale du récepteur. Un tel mécanisme a été également impliqué dans l'adressage axonal de VAMP-2 (Sampo et al., 2003) et de NgCAM (Wisco et al., 2003), ce dernier résultat s'opposant au modèle de fusion sélective proposé par Gary Banker et son équipe pour cette protéine (Sampo et al., 2003).

Dans le cadre d'un modèle d'endocytose sélective, et particulièrement l'endocytose des protéines destinées à l'axone depuis le compartiment somatodendritique, on peut imaginer que ce passage préalable par l'autre compartiment représente une étape nécessaire, sur le modèle de la

transcytose observée dans les cellules épithéliales. La transcytose neuronale a en effet été observée : depuis l'axone vers les dendrites, on pense au trafic des neurotrophines et de leurs récepteurs Trk qui sont transportés de manière rétrogrades vers le soma et parfois les dendrites (Ginty and Segal, 2002). La protéine APP est internalisée au niveau axonal puis transcytosée à la surface du compartiment somatodendritique (Simons et al., 1995; Yamazaki et al., 1995). La transcytose réciproque, depuis le compartiment somatodendritique vers le compartiment axonal, a été mise en évidence pour le récepteur à l'immunoglobuline polymérique pIgR (Ikonen et al., 1993) et pour le récepteur à la transferrine TfR (Hemar et al., 1997). Bettina Winckler et ses collaborateurs ont démontré que le récepteur NgCAM est internalisé depuis le compartiment somatodendritique avant d'apparaître à la surface axonale (Wisco et al., 2003). L'existence d'un mutant de NgCAM adressé par voie directe vers l'axone est étonnamment interprétée comme signe que la transcytose de NgCAM est nécessaire et exclusive, car elle peut être profondément modifiée par une mutation ponctuelle (Winckler, 2004). Expérimentalement, la distinction est subtile entre ce modèle de transcytose obligatoire et celui d'une transcytose « de fait », résultant de la réexpédition des protéines envoyées vers le « mauvais compartiment ». Cette dernière hypothèse est illustrée et étendue par les derniers travaux de l'équipe de Bénédicte Dargent, qui montrent que l'endocytose d'une chimère CD4-Na_v1.2 destinée au segment initial a lieu aussi bien depuis le compartiment somatodendritique que depuis les parties plus distales de l'axone (Fache et al., 2004), introduisant la complexité supplémentaire d'une compartimentalisation intra-axonale.

2.1.5 Adressage des RCPG et du récepteur CB1

Malgré leur importance dans la régulation des processus neuronaux, les RCPG ont été peu étudiés par les biologistes cellulaires en termes de trafic intracellulaire et de polarité de distribution. La plupart des connaissances concernent les récepteurs métabotropiques au glutamate mGluRs, notamment mGluR1A et mGluR2 qui sont somatodendritiques, tandis que mGluR7 est axonal (Stowell and Craig, 1999; McCarthy et al., 2001), tout comme mGluR1B (Francesconi and Duvoisin, 2002). mGluR5 est quant à lui présent à la fois dans les deux compartiments (Ango et al., 2000). Des études ont également distingué les domaines responsables de la différence d'adressage entre le récepteur 5-HT_{1A} (axonal) et 5-HT_{1B} (somatodendritique) (Ghavami et al., 1999; Jolimay et al., 2000), ainsi que l'importance du domaine PDZ dans l'adressage somatodendritique de 5-HT_{2A} (Xia et al., 2004).

Le récepteur CB1, objet de notre étude, présente une distribution de surface majoritairement axonale *in vivo* (Katona et al., 1999), mais aucune étude n'a abordé les mécanismes de son adressage vers l'axone. Dans les cultures de neurones corticaux de rat, le *binding* montre la

présence d'une quantité importante de sites de liaison correspondant à des récepteurs CB1 (150 fmol/mg de protéines). Ces récepteurs sont couplés négativement à l'adénylate cyclase, mais le couplage aux voies MPAK semble absent (Jung et al., 1997). Dans les cultures de neurones hippocampaux, le récepteur est exprimé le long des axones, et une détection des récepteurs en surface par un anticorps à épitope extracellulaire peut montrer une distribution ponctuelle, distribution colocalisant avec les synapses GABAergiques (Irving et al., 2000). Si l'on réalise le marquage après perméabilisation, certains somas sont également marqués (Irving et al., 2000). Les récepteurs CB1 à la surface de l'axone peuvent être internalisés de manière lente (16h) par un agoniste (Coutts et al., 2001).

2.1.6 Questions posées

À la suite des résultats obtenus dans les cellules HEK-293, nous avons voulu étudier le trafic intracellulaire du récepteur CB1 dans les neurones. L'idée initiale était d'examiner si le cycle constitutif d'endocytose/recyclage dû à l'activité constitutive de CB1 est présent dans les cellules neuronales. Ceci était renforcé par les nombreuses constatations d'une population de récepteurs intracellulaires au niveau somatodendritique *in vivo* (Katona et al., 1999) et *in vitro* (Coutts et al., 2001). Nous avons choisi les neurones d'hippocampe en culture car cela nous a permis d'étudier en parallèle le trafic du récepteur endogène (exprimé par 5 à 10 % des neurones de la culture) et le trafic du récepteur fluorescent (grâce à la transfection des cultures). De plus, l'utilisation de cultures dissociées permet de discriminer précisément les compartiments axonal et somatodendritique de neurones individuels, ainsi que de distinguer avec une bonne résolution les récepteurs intracellulaires et les récepteurs membranaires. Nous avons constaté que nous pouvions détecter une population intracellulaire importante ainsi que les indices d'un cycle constitutif dans le compartiment somatodendritique, mais pas dans le compartiment axonal. En effet, les récepteurs dans l'axone sont quasiment tous exprimés à la membrane plasmique, et le taux d'internalisation de ces récepteurs axonaux, constitutive ou stimulée par un agoniste, est faible.

Cette observation nous a conduit à l'hypothèse d'un adressage axonal du récepteur CB1 par endocytose sélective, similaire l'adressage axonal de la chimère CD4-Nav1.2 (Garrido et al., 2001), et selon les modèles proposés antérieurement d'adressage axonal indirect (Stowell and Craig, 1999; Trimmer, 1999). Nous avons montré que le cycle constitutif d'endocytose/recyclage du récepteur CB1 est nécessaire à la polarisation axonale de son expression de surface. Insistons sur le fait que ce cycle dépend de l'activité constitutive du récepteur : c'est donc le premier lien apporté entre l'activité constitutive d'un RCPG et sa localisation subcellulaire. Ce mécanisme nous amène à

proposer un rôle physiologique pour l'activité constitutive, celui de générer la localisation fonctionnelle de plusieurs récepteurs axonaux.

2.2 Résultats

2.2.1 Distribution de CB1 dans les neurones en culture

Nous avons étudié la localisation du récepteur CB1 dans les neurones d'hippocampe en culture. Avec Jeanne Lainé du laboratoire de Neurobiologie du Cervelet (Faculté de Médecine de la Pitié-Salpêtrière), nous avons mis au point un marquage par une combinaison d'anticorps N-Ter et C-Ter permettant l'examen détaillé par microscopie optique et électronique de la distribution des récepteurs CB1. Dans les cultures à 9 DIV (*Figure 1 de l'article 2*), les observations suivantes ont été faites :

- le récepteur CB1 est exprimé le long de réseaux axonaux très branchés, qui irriguent l'ensemble des neurones de la culture. Au niveau subcellulaire, cette distribution axonale correspond à des récepteurs CB1 présents à la membrane plasmique de l'axone. L'expression de surface est plutôt homogène le long des axones, ce qui contraste avec la localisation très ponctuelle observée par Irving et ses collaborateurs (Irving et al., 2000). On pourrait penser que cela est dû à un manque de maturité des neurones dans nos cultures à 8-10 DIV. Cependant, le marquage des synapses par la synaptophysine montre que nos cultures sont abondamment interconnectées à cet âge, et de plus la distribution du récepteur CB1 est identique dans des cultures totalement matures à 29 DIV. Ceci suggère que le récepteur CB1 n'est pas spécifiquement enrichi au niveau des terminaisons présynaptiques, mais plutôt réparti le long de l'arborisation axonale, même lorsque les neurones ont développé leur connectivité synaptique ;
- le récepteur CB1 est également présent au niveau du compartiment somatodendritique de certains neurones. Cette population correspond à environ 5 % du nombre total de neurones en culture. Tous les neurones exprimant le récepteur CB1 sont positifs pour l'enzyme GAD65, indiquant leur nature GABAergique. D'après les phénotypes observés dans ce type de culture (Benson et al., 1994) et dans l'hippocampe *in vivo* (Katona et al., 1999), ces neurones GABAergiques correspondent à des interneurons inhibiteurs ;
- au niveau somatodendritique, les récepteurs CB1 se concentrent dans des compartiments intracellulaires endosomaux. Ces endosomes peuvent être de simples vésicules mais présentent le plus souvent une topologie complexe, faite de multiples inclusions membranaires. Occasionnellement, un marquage de récepteurs CB1 à la surface

somatodendritique est observé, suggérant que le récepteur peut transiter par la membrane plasmique du compartiment somatodendritique.

2.2.2 Distribution de FCB1-eGFP dans les neurones en culture

Nous avons ensuite transfecté dans ces neurones une protéine comportant le récepteur CB1 de rat auquel sont ajoutés un épitope FLAG au bout de la queue aminoterminal extracellulaire, ainsi que l'eGFP au bout de la queue carboxyterminale, d'où son nom de FCB1-eGFP (**Figure 2 de l'article 2**). L'épitope FLAG est obtenu par insertion d'une séquence FLAG en aval d'un peptide signal membranaire (Guan et al., 1992), qui possède la particularité d'être clivé lors de la maturation du récepteur et permet l'obtention d'une extrémité FLAG libre sans méthionine initiale. Cet épitope est reconnu par l'anticorps monoclonal anti-FLAG M1, ce qui permet de marquer sélectivement les récepteurs CB1 présents à la surface avec une très grande sensibilité. L'anticorps C-Ter est quant à lui dirigé contre la queue carboxyterminale du récepteur CB1, et reconnaît à la fois la forme endogène de CB1 et la construction transfectée, ce qui nous a permis de comparer l'expression de FCB1-eGFP et celle du récepteur CB1 endogène. Nous avons ainsi vérifié que la construction n'est pas grossièrement surexprimée dans les neurones, et que les marquages des récepteurs CB1 endogènes et transfectés sont similaires. De plus, le marquage des récepteurs CB1 en surface grâce à l'anticorps anti-FLAG M1 permet de constater que la distribution subcellulaire de la construction FCB1-eGFP est similaire en tout point à celle du récepteur CB1 endogène : le récepteur est fortement exprimé à la surface de l'axone, et concentré dans des vésicules somatodendritiques intracellulaires, le marquage membranaire somatodendritique étant faible. Nous avons quantifié le rapport entre la population membranaire et totale des récepteurs CB1 grâce aux images eGFP et anti-FLAG M1 à fort grossissement : c'est le rapport S/T. Ce rapport est indépendant de la quantité totale de récepteur CB1 exprimée par un neurone donné, ce qui élimine un biais dû aux variations de niveau d'expression entre les neurones.

2.2.3 Endocytose constitutive dans le compartiment somatodendritique

La stratégie d'*antibody feeding* a été appliquée pour détecter l'endocytose du récepteur CB1 endogène, grâce à l'anticorps N-Ter dirigé contre la queue aminoterminal extracellulaire du récepteur. Au bout de deux heures, l'anticorps est présent dans des vésicules somatodendritiques (**Figure 3 de l'article 2**). On ne détecte pas d'endocytose du récepteur CB1 au niveau axonal, où le marquage reste membranaire. Le récepteur FCB1-eGFP, détecté par *feeding* avec l'anticorps M1, est également constitutivement internalisé, et si l'on applique un lavage acide après le *feeding* pour décrocher les anticorps liés aux récepteurs CB1 en surface, on observe que le marquage résistant à

cet *acid strip* est restreint aux endosomes somatodendritiques. La cotransfection de FCB1-eGFP avec la clathrine-DsRed montre que ces endosomes somatodendritiques contiennent la clathrine, argument en faveur d'une endocytose du récepteur CB1 dépendante de la clathrine (*Supplementary Figure 2 de l'article 2*).

2.2.4 Pharmacologie et trafic du récepteur endogène

Pour étudier les redistributions induites par l'activité pharmacologique du récepteur, nous avons utilisé le marquage par une combinaison d'anticorps N-Ter et C-Ter, révélés par immunoperoxidase. Les images de somas en microscopie électronique ont été utilisées pour quantifier le marquage membranaire des récepteurs CB1 somatodendritiques (*Figure 4 de l'article 2*). Cette méthode ultrasensible a permis de détecter les variations de la population somatodendritique membranaire des récepteurs CB1. Les récepteurs CB1 sont internalisés par l'agoniste WIN, et le traitement par l'agoniste inverse AM281 augmente la densité de récepteurs CB1 à la membrane somatodendritique. Par contraste, l'intense marquage membranaire axonal varie peu en présence des ligands. Ceci indique que les récepteurs CB1 sont présents de manière stable à la membrane de l'axone, quel que soit leur état d'activation pendant les trois heures que dure le traitement. L'étude des récepteurs endogènes étant cependant coûteuse en temps et en ressources, notamment le recours à la microscopie électronique, nous avons poursuivi ce travail au moyen de récepteurs transfectés fluorescents, ce qui permettait d'accéder en microscopie optique à la localisation des récepteurs en termes d'équilibres surface/intracellulaire et axonal/somatodendritique.

2.2.5 Pharmacologie et trafic du récepteur FCB1-eGFP

La redistribution intracellulaire du récepteur FCB1-eGFP sous l'effet de ses ligands a été évaluée grâce à deux quantifications (*Figure 5 de l'article 2*) :

- l'une mesure le rapport Surface/Total (S/T ratio) grâce aux images eGFP et anti-FLAG M1 du compartiment somatodendritique, permettant d'étudier l'équilibre entre les récepteurs CB1 présents à la membrane somatodendritique et dans les endosomes ;
- l'autre mesure, sur les images eGFP montrant l'ensemble des récepteurs, le rapport de fluorescence entre les récepteurs CB1 présents dans l'axone et les dendrites (A/D ratio), permettant d'évaluer les translocations éventuelles entre le compartiment axonal et somatodendritique.

Les récepteurs CB1 sont internalisés par l'agoniste WIN (1 μ M pendant trois heures). Ceci est valable pour la population membranaire somatodendritique, comme montré par la baisse du ratio

S/T, et pour une partie de la population membranaire axonale qui est transportée vers le soma, comme montré par la chute du ratio A/D. Cependant, il est notable que l'axone n'est que partiellement « vidé » de ses récepteurs CB1 par un traitement de trois heures avec l'agoniste, montrant la stabilité des récepteurs CB1 présents à la membrane axonale. L'effet de l'agoniste est détectable dès 200 nM, dose permettant de confirmer la spécificité de cet effet sur CB1.

Les récepteurs CB1 somatodendritiques sont externalisés par l'agoniste inverse AM281 (trois heures à 10 μ M), avec une uprégulation marquée de la population membranaire couplée à un marquage intracellulaire plus faible et uniforme. L'externalisation se traduit par une hausse du ratio S/T détectable pour toutes les concentrations de l'agoniste inverse testées, à partir de 200 nM. La population membranaire axonale de CB1 ne semble pas affectée par la présence de l'agoniste inverse, conformément aux observations précédentes (Coutts et al., 2001).

La présence d'une externalisation des récepteurs CB1 après traitement par l'agoniste inverse indique la présence d'un cycle endocytique analogue à celui détecté dans les cellules HEK-293, tout au moins dans le compartiment somatodendritique des neurones. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé l'endocytose du récepteur CB1 grâce à la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD). Nous avons vérifié que ce traitement inhibe également l'internalisation de la transferrine par les neurones (*Supplementary Figure 3 de l'article 2*), montrant son effet sur l'endocytose par voie dépendante de la clathrine. La M β CD provoque un effet similaire à l'agoniste inverse, transportant les récepteurs CB1 vers la membrane plasmique. Tout semble donc indiquer que le cycle d'endocytose/recyclage du récepteur CB1 présent dans les cellules HEK-293 est présent dans le compartiment somatodendritique des neurones.

2.2.6 Effet de l'endocytose constitutive sur l'adressage axonal de CB1

Cependant, les récepteurs CB1 axonaux ne semblent pas soumis à une telle régulation endocytique, et restent stables à la membrane quelle que soit l'activité du récepteur. Nous avons fait l'hypothèse qu'un mécanisme de rétention sélective maintient les récepteurs CB1 à la surface des axones, tandis que l'activité constitutive du récepteur provoque le cycle endocytique somatodendritique, assurant une quasi-absence des récepteurs CB1 à la surface somatodendritique. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la distribution du récepteur CB1 en présence de mutants dominants négatifs de protéines impliquées dans l'endocytose par voie dépendante de la clathrine (*Figure 6 de l'article 2*). La quantification de la distribution utilise le ratio Axone/Dendrite (A/D), mais calculé cette fois-ci à partir de l'image du récepteur en surface (marquage anti-FLAG M1), car c'est la polarisation de la distribution en surface qui nous intéresse.

Ce ratio A/D est nettement supérieur à 1 en condition contrôle ou en présence des protéines eGFP, eps15(DIIIΔ2) (mutant inactif de eps15), dynamine 1 et 2 sauvages ou encore Rab5 sauvage, ce qui témoigne de la distribution axonale du récepteur CB1 à la surface des neurones transfectés. Les mutant dominant négatif de eps15, dynamine 1, dynamine 2 et Rab5 sont tous capables d'inverser la polarité de la distribution des récepteurs CB1 de surface, provoquant des ratio A/D inférieurs à 1 et des distributions du récepteur CB1 majoritairement somatodendritiques à la surface des neurones. Ainsi, l'endocytose somatodendritique du récepteur CB1 est nécessaire à l'établissement de sa distribution de surface axonale.

2.2.7 Étude cinétique de la distribution membranaire du récepteur

À ce stade, un modèle d'endocytose sélective du récepteur CB1 semble sous-tendre les observations effectuées. Il est important de noter que l'endocytose de CB1 dans le compartiment somatodendritique dépend de son activité constitutive, et que cette dernière est directement manipulable par les ligands de CB1, notamment l'agoniste inverse AM281. Ainsi, à la différence des études qui montrent le rôle de l'endocytose sélective sur l'adressage de protéines membranaires axonales en générant des mutants déficients pour l'internalisation (Wisco et al., 2003), nous pouvons moduler simplement l'endocytose somatodendritique du récepteur CB1 par l'utilisation de l'agoniste inverse du récepteur. Nous avons utilisé la stratégie de blocage de l'export protéique par la bréfeldine A (BFA) pour visualiser le parcours des récepteurs CB1 amenant à la distribution axonale observée à l'équilibre, et modifié l'établissement de cette distribution grâce à l'agoniste inverse.

La BFA, qui inhibe l'activité de la GTPase Arf1, provoque un arrêt de l'export des protéines depuis le TGN vers la membrane plasmique. L'appareil de Golgi fusionne avec le réticulum endoplasmique et les protéines synthétisées s'accumulent dans ce compartiment intracellulaire (Lippincott-Schwartz et al., 1989). Si on retire la BFA par lavage, l'export membranaire reprend en quelques minutes et on peut observer la cinétique d'export d'une vague synchronisée de protéines. Nous avons appliqué ce protocole à l'étude de la polarisation de CB1 : juste après la transfection par le récepteur, les neurones sont mis pour la nuit en présence de BFA, ce qui provoque l'accumulation des récepteurs fluorescents dans le réticulum endoplasmique. Le lendemain, après rinçage de la BFA, les neurones sont marqués pour le récepteur CB1 en surface et fixés à intervalles de temps réguliers (quatre, huit et vingt-quatre heures). Des cultures sœurs de neurones sont traitées de la même façon, mais avec présence permanente de 10 μ M d'agoniste inverse AM281 dans le milieu après rinçage de la BFA. La distribution du récepteur CB1 de surface dans les neurones

transfectés est évaluée comme « pas encore en surface », « axonale », « somatodendritique » ou « uniforme », et la proportion respective de chaque population est calculée (**Figure 7 de l'article 2**).

La cinétique d'apparition du récepteur CB1 à la membrane est compatible avec un modèle d'endocytose sélective : aux temps courts (quatre et huit heures), le récepteur apparaît de manière transitoire à la membrane somatodendritique, comme en témoignent les populations de neurones possédant des distributions « uniforme » et « somatodendritique ». Les récepteurs CB1 apparaissent ensuite sélectivement dans les axones, avec une population « axonale » majoritaire après vingt-quatre heures. L'effet de l'agoniste inverse est saisissant : il stabilise la population somatodendritique des récepteurs CB1, empêchant le transport subséquent vers l'axone. En conséquence, même après vingt-quatre heures, les neurones ne présentent pas la distribution « axonale » du récepteur CB1 et le phénotype dominant est la distribution « uniforme ». Ceci montre non seulement que le récepteur CB1 est exprimé à la surface axonale grâce à un mécanisme d'endocytose sélective, mais également que cette endocytose sélective dépend de l'activité constitutive du récepteur CB1, car elle disparaît en présence d'agoniste inverse.

2.3 Article 2: "Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of CB1 cannabinoid receptor"

Cellular/Molecular

Constitutive Activation Drives Compartment-Selective Endocytosis and Axonal Targeting of Type 1 Cannabinoid Receptors

Christophe Leterrier,¹ Jeanne Lainé,² Michèle Darmon,³ Hélène Boudin,⁴ Jean Rossier,¹ and Zsolt Lenkei¹

¹Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles-Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7637, 75013 Paris, France, ²Laboratoire de Neurobiologie du Cervelet, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, 75013 Paris, France, ³Neuropsychopharmacologie, Université Pierre et Marie Curie-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche 677, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, 75013 Paris, France, and ⁴Equipe Mixte INSERM 0350, Hôpital Saint Antoine, 75012 Paris, France

The type 1 cannabinoid receptor (CB1R) is one of the most abundant G-protein-coupled receptors (GPCRs) in the brain, predominantly localized to axons of GABAergic neurons. Like several other neuronal GPCRs, CB1R displays significant *in vitro* constitutive activity (i.e., spontaneous activation in the absence of ligand). However, a clear biological role for constitutive GPCR activity is still lacking. This question was addressed by studying the consequences of constitutive activation on the intracellular trafficking of endogenous or transfected CB1Rs in cultured hippocampal neurons using optical and electron microscopy. We found that constitutive activity results in a permanent cycle of endocytosis and recycling, which is restricted to the somatodendritic compartment. Thus, CB1Rs are continuously removed by endocytosis from the plasma membrane in the somatodendritic compartment but not in axons, where CB1Rs accumulate on surface. Blocking constitutive activity by short-term incubation with inverse agonist 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (AM281) results in sequestration of recycled CB1Rs on the somatodendritic plasma membrane. Long-term inhibition of endocytosis by cotransfection of dominant-negative proteins results in impaired axonal polarization of surface-bound CB1Rs. Kinetic analysis shows that the majority of newly synthesized CB1Rs arrive first to the somatodendritic plasma membrane, from where they are rapidly removed by AM281-sensitive constitutive endocytosis before being delivered to axons. Thus, constitutive-activity driven somatodendritic endocytosis is required for the proper axonal targeting of CB1R, representing a novel, conformation-dependent targeting mechanism for axonal GPCRs.

Key words: constitutive activity; inverse agonist; targeting; plasma membrane; GPCR; axon

Introduction

G-protein-coupled receptors (GPCRs) are membrane-spanning transducers that change conformation after activation, leading to mobilization of intracellular signaling pathways. GPCRs regulate important physiological functions and represent major therapeutic targets (Pierce et al., 2002). The term “receptor” reflects the traditional view that ligand binding is mandatory for the

activation of these proteins. However, a considerable number of GPCRs, either wild-type or pathologically relevant mutants, display significant constitutive activity both *in vitro* and *in vivo* (de Ligt et al., 2000; Morisset et al., 2000): the equilibrium between inactive and active receptor conformations is shifted toward activation even in the absence of agonist ligands, leading to measurable basal activation of intracellular signaling pathways (Milligan, 2003). Antagonist ligands that inhibit this basal activation by stabilizing inactive receptor conformations are termed inverse agonists (Milligan and Bond, 1997), whereas true “neutral” antagonists inhibit binding of both agonists and inverse agonists without favoring the equilibrium between active or inactive conformations (Kenakin, 2004). Interesting consequences of constitutive activity were reported recently for GPCRs such as the type 1 cannabinoid receptor (CB1R), the 5-HT_{2C} serotonin receptor, or the α_{1a} adrenergic receptor (Leterrier et al., 2004; Marion et al., 2004; Morris et al., 2004). These constitutively active GPCRs are constitutively endocytosed from the plasma membrane and, thus, exhibit a mostly intracellular (endosomal) localization at steady-state. Inverse agonists inhibit this constitutive endocytosis, resulting in sequestration of recycled receptors on the plasma

Received Sept. 15, 2005; revised Jan. 27, 2006; accepted Jan. 28, 2006.

We thank Nathalie Sauvonnet and Alice Dautry-Varsat (Institut Pasteur, Paris, France), Robert Lodge (Institut National de la Recherche Scientifique—Institut Armand Frappier, Laval, Quebec, Canada), Hong Cao and David McNiven (Mayo Clinic, Rochester, NY), and Thomas Kirschhausen (Harvard Medical School, Boston, MA) for donating plasmids. We thank Michel Bornens and Manuel Thery (Institut Curie, Paris, France) for their help and assistance on optical imaging; Sébastien Vaie, an undergraduate student in our team, who extended the NeuronJ plugin; and Damien Carrel and Boris Emerit (Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, Paris, France) for their assistance with neuronal culture.

Correspondence should be addressed to Dr. Zsolt Lenkei, Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles—Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7637, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris, Cedex 05, France. E-mail: zsolt.lenkei@espci.fr.

H. Boudin's present address: Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U.643, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5437-05.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/263141-13\$15.00/0

membrane, a process termed externalization (Miserey-Lenkei et al., 2002). However, the physiological relevance of the constitutive endocytic cycle and, more generally, the possible biological role(s) of constitutive activity for neuronal GPCRs remain mostly unknown.

Discovered as the neuronal receptor for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Matsuda et al., 1990), the major psychoactive substance of marijuana, CB1R represents one of the most abundant GPCRs in the nervous system, highly expressed in the cerebral cortex, hippocampus, basal ganglia, and cerebellum (Howlett et al., 2002). CB1R displays a high level of constitutive activity when heterologously expressed in either non-neuronal cells or neurons (Pertwee, 2005), and we have recently reported that this constitutive activation results in constitutive endocytosis and recycling of CB1R in transfected human embryonic kidney 293 (HEK293) cells (Leterrier et al., 2004). In the present study, we investigate the physiological relevance of these findings in neurons.

First, we examined distribution and trafficking of endogenous CB1Rs in cultured hippocampal neurons. Then, by using a tagged CB1R construct, we simultaneously discriminated CB1Rs in somatodendritic versus axonal compartments as well as surface-localized versus intracellular CB1Rs in a single neuron. We found that CB1R undergoes rapid constitutive activity-driven endocytosis from the somatodendritic plasma membrane, whereas CB1Rs on the axon are endocytosed very slowly and are localized on the plasma membrane under control conditions. Thus, the presence of constitutive activity-driven endocytosis in the somatodendritic compartment but not in the axonal compartment may be the driving force for CB1R targeting to the axonal plasma membrane. Indeed, blockade of constitutive activity abolished the polarized surface distribution of newly synthesized CB1Rs. Based on these findings, we propose a new, conformation-driven targeting mechanism for axonal GPCRs.

Materials and Methods

Chemicals and antibodies. CB1R agonist (*R*)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate [WIN55,212-2 (WIN)] was from Sigma (St. Louis, MO), and CB1R inverse agonist 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-*N*-4-morpholinyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AM281) was from Tocris (Bristol, UK). Methyl- β -cyclodextrin (MBCD) was from Sigma. All culture media and additives were from Invitrogen (San Diego, CA). Lipofectamine 2000 was from Invitrogen. The anti-CB1R C-terminal (C-Ter) and N-terminal (N-Ter) antibodies were produced by Eurogentec (Seraing, Belgium) and have been characterized previously (Leterrier et al., 2004). Monoclonal mouse anti-microtubule-associated protein 2 (clone HM-2) and monoclonal mouse anti-FLAG (clone M1) were from Sigma. Alexa-Fluor conjugated secondary antibodies were from Invitrogen. Fluorescent protein-encoding plasmids were from Clontech (Mountain View, CA).

Plasmids. Our validated CB1-enhanced green fluorescent protein (eGFP) construct (Leterrier et al., 2004) was used to produce the FLAG-CB1 (FCB1)-eGFP and FCB1-enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) constructs. CB1-eGFP plasmid was digested with *Bam*HI and *Age*I to excise the CB1R coding sequence, and inserted into eYFP-N1 plasmid. Both CB1-eGFP and CB1-eYFP were digested with *Sal*I and *Bam*HI, and a synthetic oligonucleotide coding for an NH₂-terminal cleavable signal sequence (MKTIIALSIFYFLVPA) followed by a FLAG epitope (DYKDDDDA) was inserted. Post-translational cleavage of the signal sequence allows proper expression of CB1R tagged with a free N-terminal FLAG epitope (Guan et al., 1992). The two resulting constructs, named FCB1-eGFP and FCB1-eYFP, were validated by comparing their steady state distribution to both CB1-wild type (WT) and CB1-eGFP, and their agonist or inverse-agonist induced translocation in HEK293 cells (Leterrier et al., 2004). The Ras-related GTP-binding pro-

tein (rab)-enhanced cyan fluorescent protein (eCFP) plasmids were a generous gift from Dr. Robert Lodge (Université du Québec, Montréal, Québec, Canada). The light chain clathrin fused to red fluorescent DsRed protein (Engqvist-Goldstein et al., 2001) was a gift from T. Kirschhausen (Harvard Medical School, Boston, MA). The wild-type and mutant dynaminins fused to eGFP plasmids (Cao et al., 1998) were gifts from Dr. Mark A. McNiven (Mayo Clinic, Rochester, MN). The dynamin cDNAs were extracted by digestion with *Eco*RI and *Hind*III, and inserted in eCFP-N1 plasmid. The wild-type and mutant eps15-eGFP plasmids were gifts from Dr. Alice Dautry-Varsat (Institut Pasteur, Paris, France) (Benmerah et al., 2000). The eGFP sequence was cut out by digesting the plasmids with *Bsr*G1 and *Nhe*I, before insertion of the eCFP sequence obtained from digestion of the eCFP-C1 plasmid with the same enzymes.

Hippocampal neuronal cultures. Hippocampal neuronal cultures were performed essentially as described by Goslin et al. (1998) with some modifications (Jolimay et al., 2000). Briefly, hippocampi of rat embryos were dissected at embryonic days 18–19. After trypsinization, dissociation was achieved with a fire-polished Pasteur pipette. Cells were counted and plated on poly-L-lysine-coated 12-mm-diameter glass coverslips or 15-mm-diameter Thermanox coverslips (for electron microscopy), at a density of 300–400 cells/mm². The plating medium was Neurobasal supplemented with 2% B27 and containing Glutamax I (0.5 mM) and penicillin G (10 U/ml)/streptomycin (10 μ g/ml). Four hours after plating, the coverslips were transferred into Petri dishes containing supplemented Neurobasal medium that had been conditioned for 24 h on a confluent glia layer.

Neurons were transfected after 8–10 d *in vitro* (DIV) using Lipofectamine 2000, following the manufacturer's instructions. They were treated and processed 24 h after transfection. For pharmacological treatments, concentrated ligands dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) were directly added to the culture medium. The highest final concentration reached was 0.2% DMSO, and control experiments with up to 0.5% DMSO have shown the absence of effects on neuronal morphology and on the cellular distribution of CB1Rs (data not shown).

Immunocytochemistry. For standard immunocytochemistry, neurons were briefly rinsed in with Dulbecco's PBS (DPBS; Invitrogen, catalog #14040-083) and fixed in DPBS containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose. After permeabilization with 5 min incubation in DPBS containing 0.1% Triton X-100 and block for 30 min in antibody buffer (DPBS supplemented with 2% BSA and 3% normal goat serum), neurons were incubated with primary antibodies diluted 1:400–1:800 in antibody buffer for 1–2 h at room temperature or 4°C overnight. After DPBS rinses, neurons were labeled with secondary antibodies diluted to 1:400 in antibody buffer for 1 h at room temperature.

For live surface CB1R staining, anti-FLAG M1 antibody was added at 1:500–1:1000 to the culture medium and incubated for 5 min at 37°C. Neurons were briefly rinsed with DPBS, fixed in DPBS containing 4% paraformaldehyde, 4% sucrose, and incubated for 45 min in Alexa-568 goat anti-mouse secondary antibody diluted to 1:400. Coverslips were finally mounted in Mowiol (Calbiochem, La Jolla, CA) eventually containing Hoechst 33432 diluted to 1:1000.

For antibody feeding experiments, neurons were incubated for 1 h with anti-FLAG M1 antibody (1:800) before fixation, permeabilization, and staining with goat anti-mouse Alexa-568 secondary antibody (1:600). To strip M1 antibody bound to surface receptors, neurons were eventually put on ice at the end of antibody feeding and subjected to a 4 min incubation at 4°C with a solution of 0.5 M NaCl and 0.2 M acetic acid, pH 3.5, before being fixed.

BFA block. Brefeldin A (BFA) was used to accumulate synthesized CB1Rs in a golgi-endoplasmic reticulum (ER) intracellular compartment, and to allow a pulse of receptor transport after BFA washout (Wisco et al., 2003; Fache et al., 2004). Neurons were transfected as described above with FCB1-eGFP. After 3 h, the transfection medium was removed and BFA was added to 0.5–0.75 μ g/ml of final concentration. After 12–18 h, coverslips were washed twice in conditioned medium and transferred to fresh dishes containing conditioned medium, either with vehicle (0.2% DMSO) or AM281 (10 μ M). Coverslips were removed and fixed at indicated times and stained for surface CB1R with anti-FLAG M1 antibody as described above. All transfected neurons for each

condition were classified based on the surface CB1R distribution (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Classes were “not yet on surface” (CB1R is expressed as seen in the eGFP channel but still retained in ER/golgi and no surface labeling is detectable), “uniform” (CB1R is present on both somatodendritic and axonal surface), “axonal” (surface CB1R distribution is polarized mostly to the axonal plasma membrane, similar to untreated neurons), and “somatodendritic” (reversed polarization of CB1R distribution, most surface CB1R being on the surface of soma and dendrites). Proportion of neurons in the different classes was calculated in respect to the total number of transfected neurons per coverslip (ranging from 50 to 150 for each condition, the experiment being done in two independent replicates).

Microscopy. Confocal images were taken on a Leica (Nussloch, Germany) TCS NT confocal laser-scanning microscope by the use of dry 20 \times , numerical aperture (NA) 0.7, oil immersion 40 \times , NA 1.2, and oil immersion 63 \times , NA 1.32 objectives. Widefield images were taken on a Leica DM-R or a Leica DM-IRB using dry 20 \times , NA 0.7, oil immersion 40 \times , NA 1.2, and oil-immersion 100 \times , NA 1.4 objectives and Coolsnap HQ (Roper Scientific, Trenton, NJ), QImaging (Burnaby, British Columbia, Canada) QICAM or Coolsnap Fx camera, depending on experiments. In all cases, emission and excitation filters proper to each fluorophore were used sequentially and the absence of cross talk between different channels was checked with selectively labeled preparations.

For quantification of the surface/total ratio (S/T ratio), 63 \times single confocal images through the somatodendritic compartment were acquired. Alternatively, 100 \times widefield images were used in another set of experiments. Images from the green (total FCBI-eGFP or FCBI-eYFP fluorescence) and red (surface CB1R labeling) were used for quantification.

For quantification of the axon/dendrites ratio (A/D ratio), 20 \times images of transfected neurons were used. The images from either the green channel (total CB1R) or the red channel (surface CB1R) were used for quantification.

For certain illustrative images, 40 \times images were stitched to visualize the axonal arborization and 100 \times images of somas were generated by imaging stacks of 40–60 images, 0.2 μ m apart, subsequently deconvoluted using Volocity 3 (Improvision, Lexington, MA). Calculated point spread functions (PSFs) for the different wavelengths were used assuming a 100 \times , NA 1.1 objective after measurement of the real objective NA obtained from experimental PSFs obtained by imaging 0.2 μ m Tetraspek beads (Invitrogen). The iterative maximum entropy algorithm was set to 32–35 iterations.

Preembedding immunocytochemistry and electron microscopy. All procedures were applied to the neurons *in situ* (i.e., directly on their culture substratum) (plastic Thermanox coverslips; Nunc, Rochester, NY). To obtain enhanced sensitivity, a two-step labeling protocol of neurons was performed by incubating for 1 h with an antibody directed against the extracellular N terminus of CB1R (N-Ter antibody) followed by fixation, permeabilization, and immunolabeling with an antibody directed against the intracellular C terminus of CB1R (C-Ter antibody). As both N-Ter and C-Ter antibodies were produced in rabbit, the same secondary anti-rabbit serum was used to reveal both primary antibodies.

DIV 9 neurons were first incubated for 1 h at 37°C or room temperature with N-Ter antibody diluted 1:400 in the culture medium, and then fixed 30 min with 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, and 5% sucrose in 0.1 M phosphate buffer. Two aldehyde-quenching steps in 0.1% sodium borohydrate and 0.1 M glycine preceded the blocking step of nonspecific sites in 5% normal goat serum diluted in PBS with 0.01% saponin. One hour of incubation was then performed with the C-Ter antibody (1:1000) in PBS with 0.01% saponin (step omitted for the N-Ter antibody feeding experiment).

For immunoperoxidase procedures, a biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was applied as secondary antibody (1:200 in PBS plus 0.01% saponin), and the ABC peroxidase complex (Vectastain Elite; Vector Laboratories) was used for amplification. Revelation was performed by using 0.05% diaminobenzidine. For immunogold labeling, overnight incubation in ultra-small gold conjugate F(ab')₂ fragments of goat anti-rabbit IgG (1:100; Aurion, Wageningen,

The Netherlands) was followed by extensive washings, 10 min postfixation in 2% glutaraldehyde, and finally, a silver enhancement reaction (Aurion R-Gent SE-ME kit).

After OsO₄ postfixation (2% for immunoperoxidase material and 0.5% for immunogold-labeled materials) and 2% uranyl acetate *en bloc* staining, immunostained cells plated on their coverslips were dehydrated in graded acetone and finally embedded in Durcupan resin (Fluka, Buchs, Switzerland). Light microscopic visualizations were done on a Leica DMR microscope equipped with 40 \times or 100 \times objectives and a Nikon (Tokyo, Japan) DXM 1200 digital camera. Ultrathin sections were examined with a CM100 electron microscope (Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands), operated at 60 kV.

Image quantification and analysis. Three quantification methods were devised and implemented either on ObjectImage (<http://simon.bio.uva.nl/object-image.html>) or ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) software (see below). All measurements were plotted and analyzed using Graph Pad (San Diego, CA) Prism software. Significance of differences between various conditions was calculated using one-way ANOVA with Newman–Keuls post-tests for computing *p* estimates. For significance symbols (asterisks or crosses), one symbol means *p* < 0.05, two means *p* < 0.01, and three means *p* < 0.001.

For quantification of subneuronal CB1R localization, several sections of whole somas exhibiting CB1R-positive immunogold labeling were assembled from high-magnification EM images and gold beads were classified based on their ultra-structural localization as endosomal, intracellular nonendosomal, plasma membrane bound, or axonal (when a CB1R-positive axon passes along the neuronal soma). This was done for six neurons from two independent experiments and yielded the average subneuronal localizations shown in Figure 1*Ba*.

For measurement of endogenous CB1R density along somatodendritic plasma membrane, EM images of whole somas (magnification, 4800–6500 \times) from neurons labeled with N-Ter plus C-Ter antibodies and immunoperoxidase revelation were used. The plasma membrane of each soma was outlined using an assisted semiautomatic method (NeuronJ) originally developed by E. Meijering (Meijering et al., 2004) as a plugin for the ImageJ software, which detects ridge-like image features and generates optimized tracings along the centerline of ridges between user-defined key points. The plugin was modified to measure intensities along the tracings, thus allowing us to calculate the mean immunoperoxidase staining along the entire neuronal plasma membrane for a single section. This value was named the surface labeling (S). This was divided by the mean intensity along the outlined nuclear membrane (N), which was used as a normalization measurement because it is devoid of CB1R labeling and takes into account differences of membrane labeling density caused by possible variation in experimental conditions (osmification) and imaging (photography and scanning). The surface/nucleus ratio (S/N ratio) is used in Figure 4*B*.

For quantification of the CB1R surface/total ratio, a single high-resolution image of the cell body of 24–36 neurons from two to three independent experiments was used. The somatodendritic compartment was selected on the GFP (or YFP) image and the mean fluorescence of the GFP and the Alexa-568 channels in this region was measured. The ratio of these two mean fluorescences led to the S/T ratio as shown in Figure 5*Ba, Bb*.

For measurement of surface CB1R polarization, widefield 20 \times images of neurons were used. An approach similar to previous studies of protein exhibiting axonal distribution was used (Sampo et al., 2003; Wisco et al., 2003): segments were traced along morphologically identified axon and dendrites on the surface-labeled CB1R image, and the A/D ratio was computed from mean fluorescence along these segments. The A/D ratio could be calculated for eGFP images (green channel), thus measuring compartmentalization of the total CB1R population (see Fig. 5*Bc*), or for surface CB1R images (red channel), thus measuring polarization of surface CB1R expression (see Fig. 6*F*). An axonal protein has a >1 A/D ratio, whereas a somatodendritic distribution leads to a <1 A/D ratio (Sampo et al., 2003).

Results

CB1R localization in cultured hippocampal neurons

To study the subcellular localization and trafficking of CB1R, we used cultured hippocampal neurons after DIV 8–9, when polarization of axons and dendrites is complete (Dotti et al., 1988) and synapses have formed (Fletcher et al., 1994). Using a two-step labeling protocol against both the extracellular N terminus and intracellular C terminus of the receptor followed by immunoperoxidase revelation (see Materials and Methods), CB1Rs are detected in a subpopulation of neurons, representing 5–10% of the total cell population (Fig. 1A), all displaying immunoreactivity for the GABA-synthesizing enzyme GAD65 (65 kDa glutamic acid decarboxylase) (data not shown). In these neurons, CB1Rs are present in axons and in somatodendritic intracellular vesicles. Correlated electron microscopy confirmed that axonal CB1Rs are localized predominantly to the axonal surface, whereas somatodendritic CB1Rs are found mostly in large intracellular vesicles often showing complex, membranous intraendosomal morphology. A general characteristic of the CB1R-immunoreactive neurons is a relatively electrolucent cytoplasm with a well developed smooth ER and a large indented nucleus containing a prominent nucleolus. CB1R-positive “en passant” axons are often seen running along CB1R-positive somas, although it is not possible to determine which neuron a particular axon belongs to, because of high density and branching of CB1R-positive axons in the neuronal culture. Immunogold labeling of CB1R-positive somas allowed us to estimate the proportion of CB1Rs in endosomes and on the plasma membrane in the somatodendritic compartment, with ~30% of receptors localized to endosomes and between 10 and 20% of receptors expressed on the plasma membrane, the rest being intracellular, nonendosomal receptors (Fig. 1Ba). Interestingly, CB1Rs are uniformly distributed along the axonal plasma membrane and do not exhibit a punctate localization pattern, suggesting that they are not enriched in synaptic varicosities (Fig. 1Bb), an observation compatible with recent *in vivo* data on CB1R distribution on axons of hippocampal interneurons (Nyiri et al., 2005). A similar distribution is detected in older, DIV 29 neurons that possess fully mature synapses (Fig. 1C). In conclusion, endogenous CB1Rs in cultured hippocampal neurons at DIV 8–9 are expressed predominantly on the axonal plasma membrane and in somatodendritic endosomes of GABAergic interneurons.

We then transfected low-density cultures of hippocampal neurons at DIV 8–10 with an epitope-tagged CB1R bearing eGFP attached to the C terminus and a FLAG tag at the end of the extracellular N terminus (FCB1-eGFP). Addition of the C-terminal eGFP tag does not disturb the signaling and trafficking characteristics of CB1R in transfected HEK293 cells (Leterrier

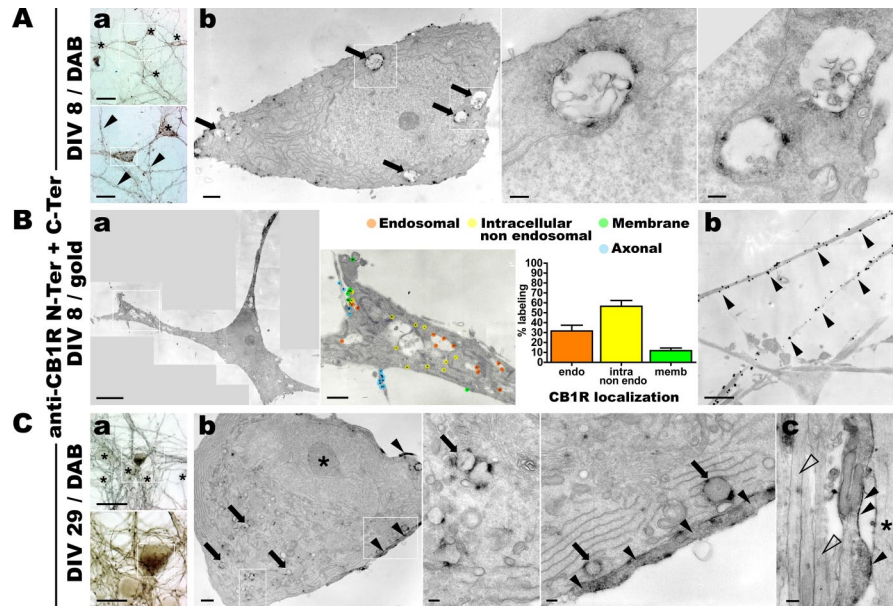


Figure 1. In cultured hippocampal neurons, endogenous CB1Rs localize at the axonal surface and in somatodendritic endosomes. Hippocampal neurons in culture are stained for endogenous CB1R using N-Ter plus C-Ter anti-CB1R antibodies in a two-step labeling protocol (see Materials and Methods). **A**, Neurons at DIV 9 are stained for CB1R using immunoperoxidase labeling. **Aa**, Top, Bright-field image of a CB1R-positive neuron (boxed) surrounded by immunonegative neurons (asterisks). Numerous CB1R-positive axon bundles are also present. Scale bar, 50 μ m. Bottom, A closer view of this neuron reveals labeled axon (arrowheads) and vesicular staining in the soma and dendrites (boxed). Scale bar, 20 μ m. **Ab**, Left, Correlated electron microscopy of the CB1R-positive neuron boxed in **Aa** shows CB1R staining in large endosomes in the soma (arrows, boxes). Scale bar, 1 μ m. Center, Right, Detailed views of several CB1R-positive somatic endosomes exhibiting complex membranous structure. Scale bar, 0.2 μ m. **B**, Neurons at DIV 9 are labeled for CB1R using immunogold labeling. **Ba**, Left, Montage of high-magnification EM images showing a whole CB1R-positive soma. Scale bar, 5 μ m. Center, Zoom on the boxed area showing immunolabeling for CB1R and classification of gold beads as labeling endosomal, intracellular nonendosomal, plasma-membrane bound, or axonal (en passant axons along CB1R-positive somas) receptors. Scale bar, 1 μ m. Right, Graph of the average ultrastructural localization of CB1R based on the classification of labeling for two to eight sections of six CB1R-positive somas. Approximately 30% of labels are found inside endosomes, whereas surface labeling represents only 10–20% of total labeling. Values are mean \pm SEM. **Bb**, CB1R-positive axons showing dense CB1R labeling homogeneously distributed on the axonal surface (arrowheads). Scale bar, 1 μ m. **C**, Neurons at DIV 29 are labeled for CB1R using immunoperoxidase staining. **Ca**, Bright-field views of a CB1R-positive neuron (boxed) surrounded by immunonegative neurons (asterisks). Scale bars: top, 50 μ m; bottom, 20 μ m. **Cb**, Correlated electron microscopy of the same neuron showing the somatic region with CB1R-positive endosomes (boxes and arrows) and CB1R-positive axons passing along the soma (arrowheads). Left, Note the deeply indented nucleus with prominent nucleolus (asterisk). Scale bars: left, 1 μ m; center, right, 0.2 μ m. **Cc**, Axonal bundle along a dendrite (asterisk) containing a CB1R-positive axon with homogenous labeling along the plasma membrane (arrowheads) and immunonegative axons (empty arrowheads). Scale bar, 0.2 μ m.

et al., 2004), nor did addition of the small N-terminal FLAG (see Materials and Methods). In our hands, the expression level of FCB1-eGFP is comparable with that of endogenous CB1Rs, as shown by the comparable intensities of labeling with the C-Ter antibody (Fig. 2A, middle panel in red). The FCB1-eGFP receptor is properly targeted to axons and present in somatodendritic vesicles (Fig. 2B, boxed soma), similarly to the subcellular distribution of endogenous CB1Rs, as seen in a nontransfected CB1R-positive neuron nearby (lower boxed soma; see also indirect comparison in supplemental Fig. 1A,B, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Simultaneous detection of surface (extracellular FLAG epitope) and total receptor (eGFP) populations confirms that, similarly to endogenous CB1Rs, axonal FCB1-eGFPs are mostly surface-bound, whereas somatodendritic FCB1-eGFPs are predominantly intracellular (Fig. 2B). A control experiment measuring the proportion of FCB1-eGFPs that are present on the somatodendritic plasma membrane of individual neurons displaying various expression levels (S/T ratio) (Fig. 2C), shows that endosomal localization does not depend on the total quantity of receptors expressed by a particular

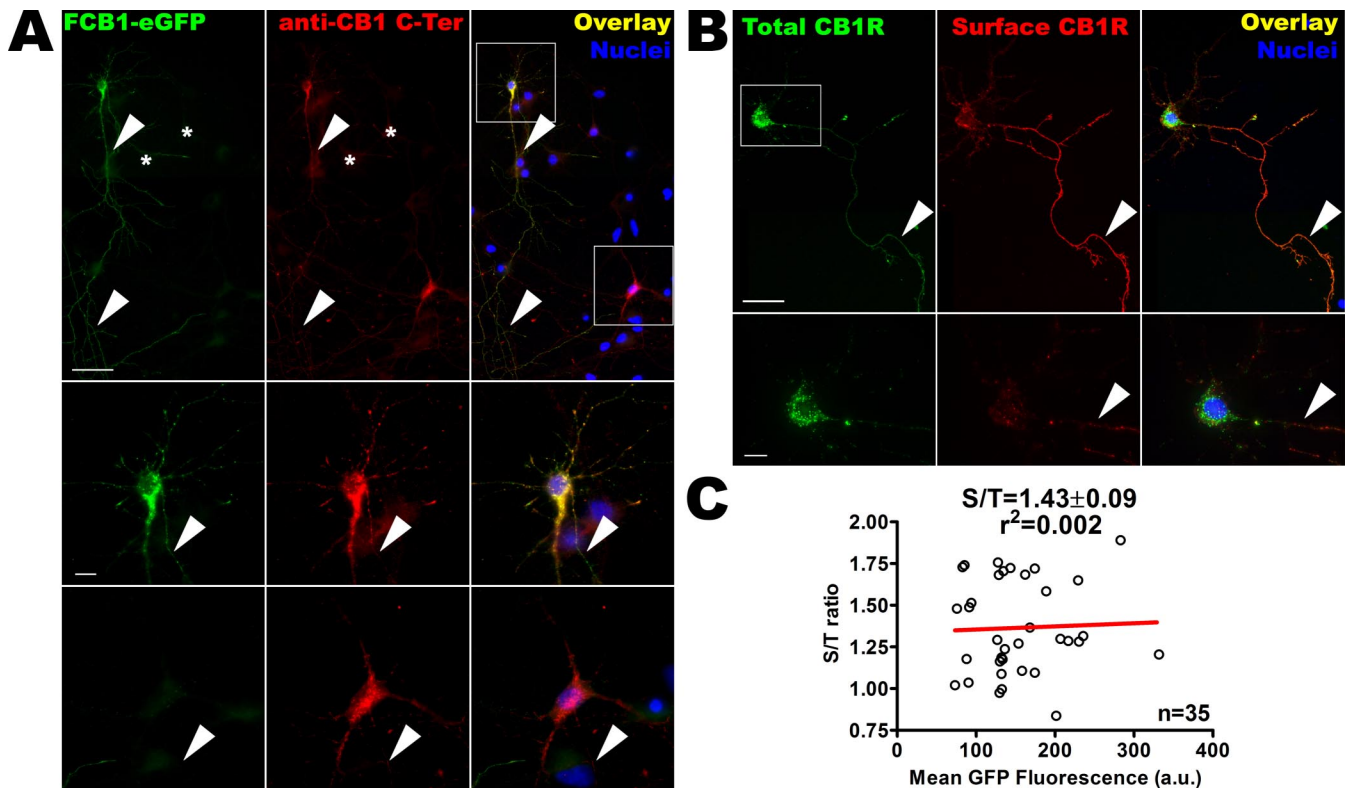


Figure 2. FCB1-eGFP is properly expressed and targeted to the axonal surface and somatodendritic endosomes. **A**, Comparison of the distribution of endogenous CB1R and transfected FCB1-eGFP by detection of eGFP fluorescence (in green) and labeling with the anti-CB1R C-Ter antibody (labeling both endogenous and transfected CB1Rs, red). The top shows soma, dendrites, and axonal arborization of an FCB1-eGFP transfected neuron (top left box) together with a neuron expressing endogenous CB1R (bottom right box). Positive neurons are surrounded by CB1-negative neurons (asterisks, nuclear staining in blue). CB1R as well as FCB1-eGFP show vesicular staining in the somatodendritic compartment (boxed) and homogenous staining on the axon (arrowheads). Notably, the comparable intensity of C-Ter antibody labeling (red) shows that transfection of FCB1-eGFP leads to expression levels similar to those of endogenous CB1Rs. Bottom panels show details of neurons boxed at the top. Vesicular staining can clearly be seen in the soma and in dendrites, together with emergence of the labeled axon (arrowheads). Scale bars: top, 50 μm ; bottom panels, 10 μm . **B**, Presence of the FLAG epitope allows highly sensitive labeling of surface receptors (in red) by rapid live incubation of transfected neurons with M1 anti-FLAG antibody. Intracellular eGFP labeling (in green) is brighter than surface eGFP labeling, because of the concentration of receptors in endosomes. Because of the high sensitivity of the red FLAG epitope surface labeling, surface CB1Rs are far more visible in the red channel than in the green channel (see in axons where surface receptors are more visible in the red channel than in the green channel; arrowheads). Surface CB1Rs are hardly detectable on the somatodendritic plasma membrane [see red channel in boxed region, detailed in bottom image], whereas they are concentrated in the axon (arrowheads). Scale bars: top, 50 μm , bottom, 10 μm . **C**, FCB1-eGFP construct allows to measure the CB1R S/T ratio on the somatodendritic compartment of individual neurons using the ratio between green (eGFP total receptor fluorescence) and red (surface labeling with M1 antibody) channels. This ratio does not depend on the FCB1-eGFP level of expression in each particular neuron; there is no correlation between the value of mean eGFP fluorescence and the value of the S/T ratio for 35 individual somas of FCB1-eGFP expressing neurons in the control condition, as plotted here ($r^2 < 0.02$, as assessed by Pearson's test). This implies that surface expression of CB1R does not depend on transfection potency or variation in expression levels between individual neurons or between experimental conditions. The data points shown come from three independent experiments.

neuron, as shown by the lack of correlation ($r^2 = 0.002$, Pearson's test) between eGFP fluorescence and the corresponding S/T ratio. Electron microscopy using anti-eGFP antibody confirmed the similar localization for endogenous and transfected CB1Rs, namely on the axonal surface and in large and complex somatodendritic vesicles (supplemental Fig. 1C, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Finally, incubation of transfected neurons with protein synthesis inhibitor cycloheximide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for up to 6 h (Goslin and Banker, 1990) failed to induce significant reduction in the intracellular labeling of CB1R (data not shown), indicating that the majority of intracellular CB1Rs are not in the neosynthetic pathway, but could be rather of endocytic origin.

CB1R is constitutively endocytosed primarily in the somatodendritic compartment

To test whether endosomal CB1Rs correspond to receptors constitutively endocytosed from the plasma membrane, we incubated live neurons with the N-Ter antibody directed against the extracellular N terminus of endogenous CB1R. After 2 h, cells

were fixed, permeabilized, and the N-Ter antibody was revealed with immunoperoxidase staining (Fig. 3A). The N-Ter antibody labeled surface receptors on axons but also numerous endosomes in the somatodendritic compartment, showing that receptors labeled with the N-Ter antibody have been constitutively endocytosed. At the EM level, recently endocytosed CB1Rs are localized to large endosomes displaying a complex membranous structure, often in close apposition to the somatodendritic plasma membrane (Fig. 3Ab). Strikingly, in axons, we did not observe intracellular CB1R-positive endosomes or pits, suggesting that constitutive endocytosis occur mostly from the somatodendritic surface.

These results were confirmed and extended using FCB1-eGFP transfected neurons that were incubated for 1 h with the M1 antibody directed against the extracellular FLAG epitope (Fig. 3B,C). Detection of the M1 antibody with a red fluorescent secondary antibody results in intense labeling of the axonal surface. Importantly, surface labeling of the somatodendritic compartment is barely visible, whereas the majority of CB1R-containing somatodendritic vesicles also contained the M1 antibody (Fig.

3B, compare the punctate red labeling with surface labeling alone in Fig. 2B). Interestingly, M1 antibody incubation of neurons cotransfected with FCB1-eGFP and clathrin-DsRed (Engqvist-Goldstein et al., 2001) leads to colocalized puncta of eGFP, clathrin, and endocytosed M1 in the soma and dendrites of transfected neurons (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material), suggesting that CB1R constitutive endocytosis is primarily clathrin-mediated. To visualize more specifically endocytosed receptors, the M1 antibody bound to surface CB1Rs was stripped with an acid wash after feeding. Surface axonal labeling is greatly reduced, whereas soma and dendrites still contain brightly labeled puncta (Fig. 3C). This suggests that a substantial proportion of the intracellular CB1Rs found in the soma and dendrites are in fact of recent (<1 h) endocytic origin. The relative paucity of endosomal labeling in the axonal compartment suggest that axonal receptors mostly reside on the plasma membrane and are not subject to intense constitutive endocytosis. The M1 anti-FLAG antibody feeding was CB1R-specific, as shown by the lack of red labeling in nontransfected cells, and did not provoke CB1R endocytosis by itself because the localization of FCB1-eGFP labeling (total CB1R population) is not changed whether M1 incubation is absent (supplemental Fig. 1B, available at www.jneurosci.org as supplemental material), short (Fig. 2B, 5 min for surface labeling), or long (Fig. 3B, 1 h feeding; supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In conclusion, antibody feeding experiments show that CB1R is constitutively endocytosed in neurons, particularly in the somatodendritic compartment.

Pharmacology and trafficking of CB1Rs in cultured hippocampal neurons

We then asked whether the observed constitutive endocytosis of CB1R is linked to the pharmacological state of the receptor. Using the highly sensitive preembedding two-step immunocytochemistry for electron microscopy, it was possible to detect and quantify endogenous CB1R expression in the somatodendritic compartment of cultured neurons, including the weak surface expression on the somatodendritic plasma membrane (Fig. 4A). To reveal the antibodies, immunoperoxidase revelation was used because immunogold labeling was not sensitive enough to yield consistent quantitative results. For the quantification of membrane labeling density, we developed a semiautomatic method based on the NeuronJ plugin (Meijering et al., 2004) that minimizes the impact of human intervention by automatically detecting the local maximum of labeling density. The mean labeling intensity along the plasma membrane (S) was measured and the mean intensity along the nuclear envelope of the same cell (N), devoid of CB1R staining, was used as an internal control of mem-

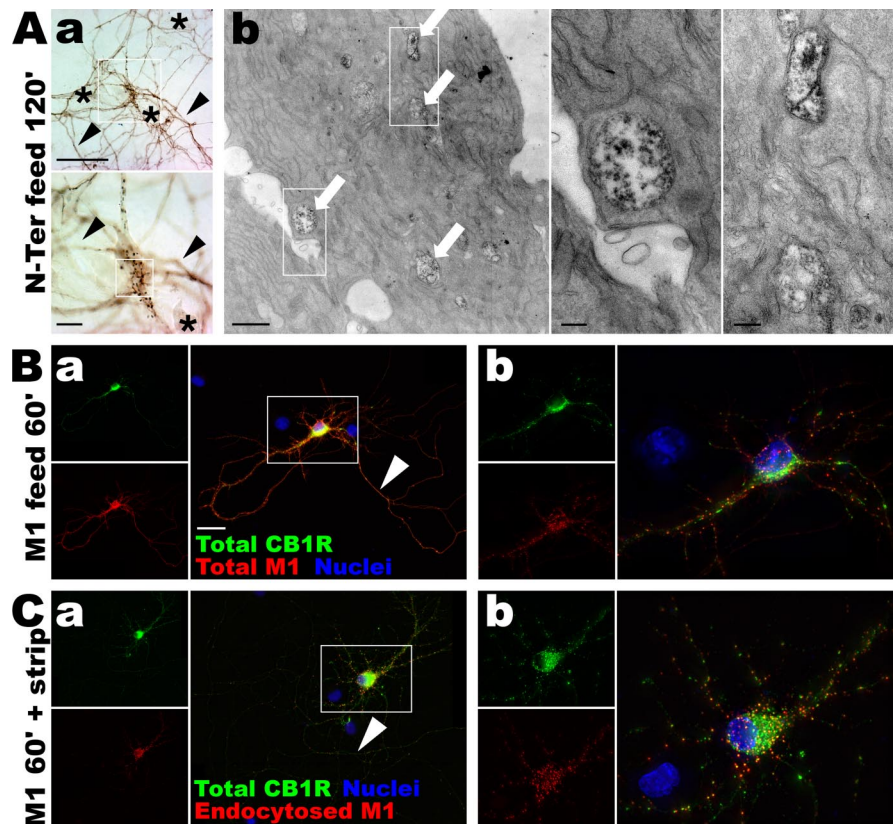


Figure 3. CB1R is constitutively endocytosed, preferentially in the somatodendritic compartment. **A**, Living neurons at DIV 9 are fed for 2 h with the N-Ter antibody directed against the extracellular N terminus of the endogenous CB1R. **Aa**, After permeabilization and immunoperoxidase staining, the N-Ter antibody labels axons (arrowheads) and somatodendritic vesicles in the soma of CB1R-positive neurons (boxed). Neurons not expressing CB1R do not uptake the N-Ter antibody (asterisks). Scale bars: top, 50 μm ; bottom, 10 μm . **Ab**, Correlated electron microscopy of the same neuron showing labeled endosomes within the soma (arrows) that have endocytosed the N-Ter antibody. Scale bars: left, 1 μm ; right panels, 0.2 μm . **B**, DIV 9 neurons expressing FCB1-eGFP (green) are fed for 1 h with anti-FLAG M1 antibody (red). The M1 antibody labels axons (**Ba**, arrowhead) and shows punctate pattern of CB1R red labeling on the soma and dendrites (**Bb**), indicating constitutive endocytosis of CB1R. Scale bar, 20 μm . **C**, Neurons expressing FCB1-eGFP are fed for 1 h with M1 antibody. Surface-bound antibodies are then stripped by an acid wash, leaving only primary antibodies bound to endocytosed receptors. After fixation and permeabilization, red secondary labeling shows few endocytosed receptors in the axon (**Ca**, arrowhead) whereas the somatodendritic compartment contains numerous antibody-labeled endosomes (**Cb**), showing that constitutive endocytosis of CB1R occurs primarily in the somatodendritic compartment.

brane labeling intensity (S/N ratio; see Materials and Methods) (Fig. 4B).

In vehicle-treated cells, similarly to nontreated neurons (see above), CB1Rs are present predominantly inside endosomes but also on discrete locations along the plasma membrane. CB1R-positive en passant axons running along the somatic membrane are also clearly distinguishable. Neurons treated for 3 h with the agonist WIN (1 μM) exhibit more CB1R-positive endosomes and are devoid of surface labeling on the somatodendritic plasma membrane, except inside small pits. On labeled axons, CB1Rs are downregulated but are still present on the plasma membrane. After 3 h treatment with the inverse agonist AM281 (Gifford et al., 1997) at 10 μM , CB1Rs are upregulated at the somatodendritic plasma membrane, localized to intensely stained patches and large pit-like structures, and are abundant on axons. Quantification of the immunoperoxidase staining intensity on the plasma membrane shows that somatodendritic surface receptors are significantly downregulated by WIN treatment, whereas inverse agonist AM281 leads to enhanced surface localization (Fig. 4B). This suggests that WIN promotes endocytosis from the plasma membrane, whereas AM281 inhibits constitutive endocytosis, re-

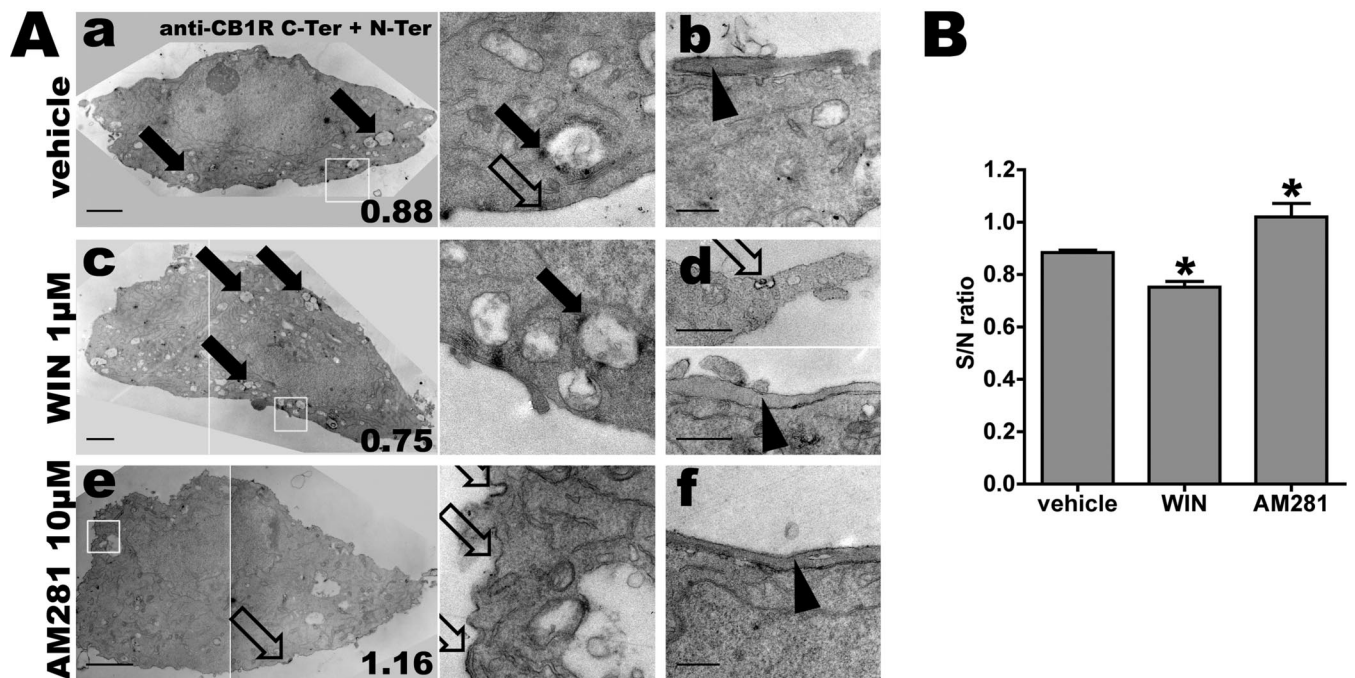


Figure 4. Somatodendritic trafficking of endogenous CB1R after pharmacological treatments. **A**, Hippocampal neurons at DIV 9 are incubated for 3 h with either 0.2% DMSO as vehicle (**Aa, Ab**), 1 μM agonist WIN (**Ac, Ad**), or 10 μM inverse agonist AM281 (**Ae, Af**). Anti-CB1R N-Ter feeding plus C-Ter immunolabeling followed by immunoperoxidase staining is performed to maximize sensitivity. Shown are representative somas and proximal dendrites for the three conditions. The right panels in **Aa, Ac**, and **Ae** are detailed images from the boxed areas in the left panels. Scale bars: somas, **Aa, Ac, Ae**, 2 μm ; details, **Ab, Ad, Af**, 0.5 μm . For the right column, the S/N ratio of this individual cell is indicated in the lower right corner, referring to the quantification in **B**. In control conditions (**Aa, Ab**), receptors are mostly found in somatic endosomes (**Aa**, filled arrows), with sparse labeling of the somatodendritic plasma membrane (**Aa**, right, empty arrow). CB1R-positive en passant axons exhibit a dense surface staining (**Ab**, arrowhead). Treatment with agonist WIN downregulates somatodendritic surface CB1Rs and upregulates CB1R-positive endosomes (**Ac**, filled arrows). Note that remaining surface CB1Rs are now found inside pits (**Ad**, top, empty arrow) and that axonal surface labeling is still partially present (**Ad**, bottom, arrowhead). Treatment with inverse agonist AM281 upregulates somatodendritic surface receptors that often appear as patches on the plasma membrane (**Ae**, empty arrows). Axonal labeling is not significantly different from control condition (**Af**, arrowhead), as seen on CB1R-positive axons passing along CB1R-positive somas. **B**, Quantification of CB1R translocation for endogenous CB1R (corresponding to images shown in **A**). S/N ratio represents the ratio between mean plasma membrane intensity (with eventual CB1R staining) and nuclear membrane intensity (used as control). Five neurons are quantified for each condition. WIN-treated neurons exhibit a drop in S/N ratio, showing downregulation of plasma membrane CB1Rs, whereas AM281-treated neurons exhibit higher S/N ratios, with enhanced plasma membrane labeling. The bars show the mean, the error bars indicate the SEM, and the asterisks indicate significance between the vehicle and treated conditions, as defined in Materials and Methods.

sulting in sequestration of CB1Rs on the somatic plasma membrane.

We confirmed and extended these results by using cultured hippocampal neurons transfected with FCBI-eGFP (Fig. 5A). This approach allows a more precise and sensitive measure of (1) the proportion of CB1Rs that are on the neuronal surface and (2) the translocation of CB1Rs between axonal and somatodendritic compartments of individual neurons. The first parameter measures of the ratio between fluorescence from CB1R on the plasma membrane (S; detected by rapid live staining with M1 anti-FLAG antibody) versus total CB1R fluorescence (T; detected with the eGFP tag), yielding the S/T ratio (Fig. 5Ba,Bb). The second parameter measures the effects of pharmacological treatments on the relative compartmentalization of CB1Rs between the axon and the somatodendritic compartment. It is obtained by tracing segments along axon and dendrites (as defined morphologically) on low magnification (20 \times) images of neurons and by measuring the ratio between somatodendritic and axonal staining intensities in the green (eGFP) channel, yielding the A/D ratio of the total receptor population (Fig. 5Bc).

Vehicle-treated neurons show relatively few receptors present on the somatodendritic plasma membrane, accompanied by a high level of CB1R expression on their axonal arborization and numerous somatodendritic CB1R-containing endosomes (Fig. 5Aa,Ab). The relatively low A/D ratio (Fig. 5Bc) is attributable to the very intense label of the somatodendritic endosomes accom-

panied by a lower but more homogenous expression of axonal CB1Rs.

Treatment with agonist WIN55,212-2 (1 μM) for 3 h leads to neurons that are devoid of somatodendritic surface receptors, and CB1R-positive endosomes are abundant in the somatodendritic compartment (Fig. 5Ac,Ad,Ba). In axons, CB1R endocytosis is also detected as a decrease in surface labeling, but seems to be rather incomplete after 3 h (Fig. 5Ac). This is consistent with previous data showing that disappearance of surface axonal CB1Rs is complete only after 16 h of agonist incubation in cultured hippocampal neurons (Coutts et al., 2001). In addition, WIN induces a significant decrease of the A/D ratio, showing that agonist-mediated activation resulted in partial translocation of the neuronal CB1R population from the axon to somatodendritic endosomes (Fig. 5Bc). Concomitant decrease of CB1R surface staining (red) and total CB1R (green) in axons suggests that the majority of CB1Rs endocytosed in the last 3 h from the axon have already reached the somatodendritic compartment. These results suggest that the limiting factor in agonist-induced somatodendritic translocation of axonal CB1 receptors is the relatively slow endocytosis rate from the axonal membrane but not the velocity of retrograde axonal transport.

Treatment with inverse agonist AM281 has an opposite effect on the distribution of surface CB1R: neurons exhibit a striking upregulation of CB1Rs on the somatodendritic surface after 3 h of treatment (Fig. 5Ae,Af,Ba), whereas no obvious change is de-

tected on the axonal surface (Fig. 5*Ae*). In the somatodendritic compartment, this phenomenon of translocation toward the plasma membrane indicates that AM281 blocks constitutive endocytosis of CB1R.

For both ligands, the extent of somatodendritic translocation (*S/T* ratio) was concentration-dependent, with significant effect from the lowest concentration tested (i.e., 200 nM) (Fig. 5*Bb*). Namely, 200 nM WIN elicited significant internalization of CB1Rs from the somatodendritic plasma membrane, whereas 200 nM AM281 was able to translocate receptors from endosomes to the plasma membrane. Moreover, a concentration of 1 μ M AM281 was able to fully antagonize the effect of 1 μ M WIN, even translocating CB1Rs toward the plasma membrane as efficiently as AM281 alone. This confirms that the effect of WIN is CB1R-specific and that AM281 is a bona fide antagonist/inverse agonist of the CB1R.

If AM281 acts by stabilizing receptors in an inactive conformation, thus blocking constitutive endocytosis, its effect on CB1R distribution could be mimicked by blocking GPCR endocytosis. We thus incubated FCB1-eGFP transfected neurons with MBCD (5 mM for 30 min), which strongly inhibits endocytosis, but not recycling of the transferrin receptor (Subtil et al., 1999) and of CB1R (Letierrier et al., 2004), through acute depletion of plasma membrane cholesterol. We verified that in our experimental setup, this acute treatment with MBCD significantly inhibits neuronal endocytosis as indicated by significant reduction of transferrin uptake (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). After MBCD treatment, CB1Rs are upregulated on the somatodendritic surface (Fig. 5*Ag,Ah*) and are still present on the axonal surface (with no detectable change compared with control), suggesting that AM281 and MBCD both inhibit CB1R constitutive endocytosis in the somatodendritic compartment. Thus, receptors recycled from intracellular endosomes are accumulating on the somatodendritic plasma membrane, resulting in the observed upregulation of surface-bound receptors as measured by the rise of the *S/T* ratio (Fig. 5*Ba*). Neither AM281 nor MBCD treatment significantly changed the *A/D* ratio of the total receptor population (Fig. 5*Bc*) or the total number of CB1Rs, as shown by the unchanged level of total eGFP fluorescence (data not shown), indicating that their main effect in the time-scale studied (between 30 min and 3 h) is a translocation from endosomes to plasma membrane within the somatodendritic compartment.

In conclusion, our results indicate that a constitutive cycle of CB1R endocytosis and recycling exist in the somatodendritic compartment of cultured neurons, similarly to the constitutive

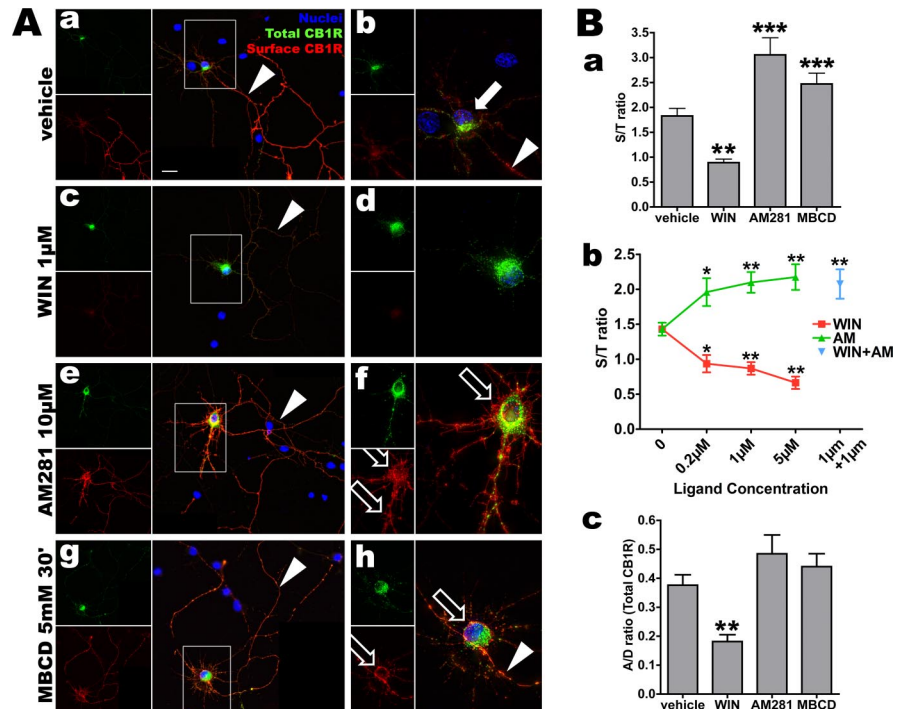


Figure 5. Somatodendritic CB1R trafficking is dependent on the pharmacological state of CB1R. **A**, Neurons expressing FCB1-eYFP are incubated for 3 h with vehicle (0.2% DMSO; **Aa, Ab**), WIN (1 μ M; **Ac, Ad**), AM281 (10 μ M; **Ae, Af**), or 30 min with MBCD (5 mM; **Ag, Ah**), then rapidly labeled for surface receptors with M1 antibody and fixed. eYFP signal (in green) corresponds to total CB1R population and surface labeling is revealed in red. Left panels (**Aa, Ac, Ae, Ag**) show the neuron with its axonal arborization (montage of two images) and right panels (**Ab, Ad, Af, Ah**) are a projection of a deconvoluted 10 μ m z-stack (0.2 μ m z-step) taken with a 100 \times objective. Images for vehicle, WIN, and AM281 conditions were acquired and processed identically to preserve relative staining intensities. Scale bar: (in **Aa–Ah**), 20 μ m. In control cells, surface CB1R is found on the axonal arborization (**Aa**, arrowhead) whereas somatodendritic receptors are mostly endosomal (arrow in **Ab**, highlighting the soma of the transfected neuron). Note the axon on **Ab** that is brightly labeled for surface CB1R just after the axon hillock (arrowhead). After WIN treatment, somatodendritic surface receptors are barely visible, whereas endosomes are abundant in the soma and dendrites (**Ac, Ad**). Axonal surface receptors are downregulated but still present (**Ac**, arrowhead). Somatodendritic surface labeling is strongly enhanced after AM281 treatment (**Af**, empty arrows) and axonal surface labeling is still strong (**Ae**, arrowhead). Blocking endocytosis with MBCD leads to a CB1R distribution similar to AM281 treatment with upregulation of surface expression of CB1R on the somatodendritic plasma membrane (**Ah**, empty arrows). **B**, Quantifications of CB1R translocation in neurons transfected with FCB1-eYFP (corresponding to images shown in **A**). **Ba**, Transfected neurons are quantified using the *S/T* ratio of 24–36 neurons per condition from two to three independent experiments. WIN downregulates surface population of CB1Rs leading to a drop of the *S/T* ratio, whereas inverse agonist AM281 upregulates plasma membrane receptors, similarly to endocytosis blocker MBCD, that lead to a rise of the *S/T* ratio. **Bb**, Effects of both WIN and AM281 on CB1R localization are concentration-dependent (red curve for WIN, green curve for AM281) and resulting *S/T* ratios are significantly different from control for all concentrations tested. AM281 antagonizes WIN because coapplication of both ligands at 1 μ M leads to upregulation of the surface receptor similarly to treatment with AM281 alone (blue data point). **Bc**, CB1R localization in transfected neurons is quantified as the *A/D* ratio, that is the ratio of intensities between dendrites and axon for total CB1R (green channel) in individual neurons in each condition ($n = 24–26$ neurons from two independent experiments). WIN is able to translocate CB1R from axon to soma, as shown by the decrease in *A/D* ratio, whereas AM281 and MBCD do not have a significant effect on the compartmentalization of CB1R between axonal and somatodendritic compartment. In all quantifications, values are mean \pm SEM and asterisks show significance between vehicle and treated conditions, as defined in Materials and Methods.

cycle characterized in HEK293 cells (Letierrier et al., 2004). This cycle is dependant on the pharmacological state of the receptor, because CB1R agonist and inverse agonist modulate equilibrium between surface and endosomal CB1R populations. Strikingly, axonal CB1Rs are localized on the plasma membrane, their spontaneous internalization is almost undetectable and even agonist treatment for 3 h results in a relatively slow rate of endocytosis.

Mutant proteins interfering with constitutive endocytosis of CB1Rs perturb axonal distribution of surface CB1Rs

If CB1R is constitutively endocytosed in the somatodendritic region but not in axons, continuous blockade of endocytosis could

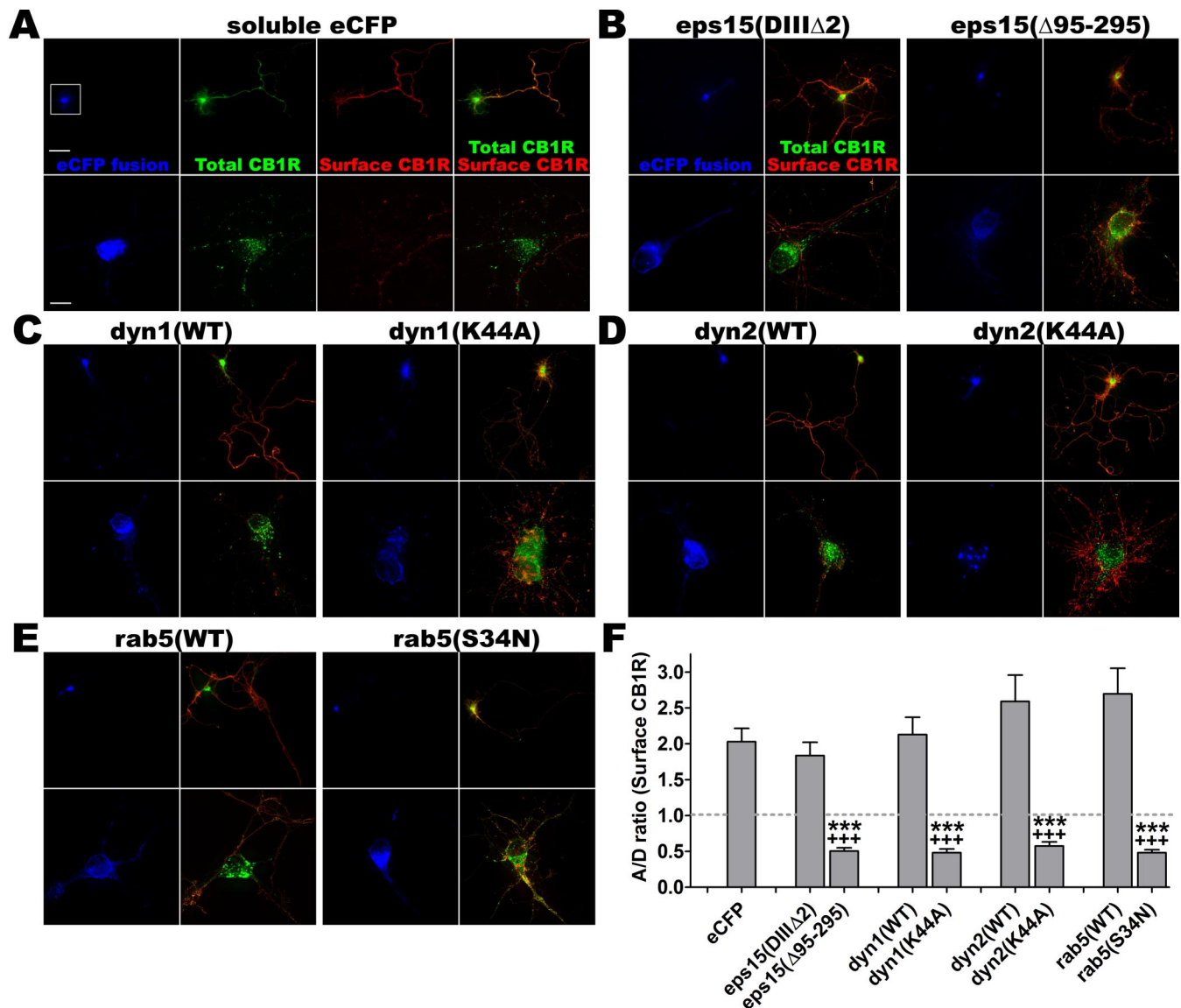


Figure 6. Inhibition of neuronal endocytosis shifts surface expression of CB1R from the axon to soma and dendrites. Hippocampal neurons at DIV 8 are cotransfected with FCB1-eYFP (green) and a fusion of eCFP (blue) with various proteins: soluble eCFP as a control (**A**), inactive mutant eps15(DIIIΔ2) or dominant-negative eps15(Δ95–295) (**B**), wild-type dyn1(WT) or dominant-negative dyn1(K44A) (**C**), wild-type dyn2(WT) or dominant-negative dyn2(K44A) (**D**), wild-type rab5(WT) or dominant-negative rab5(S34N) (**E**). Twenty-four hours later, they are stained for surface CB1Rs (red) and fixed. For each condition, the top panel is a 20× image of the neuron with its axonal arborization (scale bar, 50 μm) and the bottom panel is a z-projection of a deconvoluted 10 μm stack (0.2 μm Z-step) taken with a 100× objective (scale bar, 10 μm). Wild-type or inactive proteins do not change polarization of CB1R surface expression (red labeling, left panels), whereas dominant-negative mutants of eps15 (**B**), dyn1 (**C**), dyn2 (**D**), and rab5 (**E**) strongly upregulate somatodendritic surface CB1R expression (red somatodendritic labeling, right panels). **F**, Quantification of the A/D ratio, that is the ratio of intensities between dendrites and axon for surface CB1R (red channel) in individual neurons in each condition ($n = 20$ neurons from two independent experiments). Values are mean \pm SEM and asterisks show the significance between eCFP alone and eCFP-protein fusions. Crosses show significance between control eCFP-protein fusion (inactive mutant for eps15 and WT proteins for rab5 and dynamins) and dominant-negative eCFP-protein fusion. Quantifications show that eCFP alone or control proteins (either WT or inactive mutant) do not significantly modify the axonal surface CB1R distribution ($A/D > 1$), but dominant-negative mutants reverse the polarity of CB1R surface expression, which is then mostly somatodendritic ($A/D < 1$), showing the role of endocytosis in proper surface distribution of CB1R in neurons.

perturb the polarized distribution of surface CB1Rs. Thus, we coexpressed CB1R with different wild-type or dominant-negative mutant proteins, known to inhibit endocytosis, and examined the effects on the subcellular distribution of CB1R. The effect of the cotransfected proteins on the axonal polarization of surface CB1Rs was assessed by the A/D ratio measured on the surface CB1R images (red channel) for neurons fixed and stained 24 h after cotransfection of FCB1-eYFP with various wild-type or mutant proteins.

We studied the effects of dominant-negative mutants of eps15, dynamin-1, dynamin-2, and rab5 (Fig. 6). Eps15 is an AP-2 binding protein that is involved in clathrin-mediated endocytosis (Benmerah et al., 2000). Dynamin GTPases participate in

the last step of endocytosis by pinching the vesicle from the plasma membrane (Cao et al., 1998). Finally, early steps in CB1R endocytic trafficking are driven by the small GTPase rab5 (Leterrier et al., 2004), a protein that has been shown to participate in endocytosis of numerous GPCRs (Seachrist and Ferguson, 2003). Coexpression of the eCFP-tagged control constructs do not significantly change the distribution of CB1R compared with soluble eCFP (Fig. 6A, B–E, left). Strikingly, cotransfection of the dominant-negative mutant proteins eps15(Δ95–295) as well as dyn1(K44A), dyn2(K44A), and GDP-locked rab5(S34N) enhances surface expression of CB1R on the somatodendritic membrane with a concomitant decrease of CB1R expression at the axonal surface (Fig.

6B–E, right), leading to a more somatodendritic phenotype and a fall of the A/D ratio (Fig. 6F).

These results suggest that in neurons, CB1Rs are constitutively endocytosed in an eps15- and dynamin-dependent manner and that subsequent trafficking depends on rab5. Moreover, inhibition of this constitutive endocytosis retains CB1Rs on the somatodendritic plasma membrane and leads to improper distribution of surface-localized CB1Rs, showing that constitutive endocytosis from the somatodendritic plasma membrane is necessary for the polarized distribution of CB1R in neurons.

Kinetic analysis unravels the role of constitutive activity and endocytosis in axonal targeting of CB1Rs

Whereas CB1R constitutively cycles between cell surface and intracellular endosomes in the somatodendritic region, the situation is clearly different in the axonal compartment. Axonal CB1Rs are localized on the surface at steady state and their endocytosis is slow even in the presence of an agonist (our results above) (Coutts et al., 2001). Interestingly, this difference in endocytic rates may be sufficient to explain the polarized distribution of CB1Rs on the neuronal surface at steady state. In this scenario, newly synthesized CB1Rs are first delivered indiscriminately to the somatodendritic and the axonal plasma membrane. Subsequently, distribution polarized to the axonal surface is established and maintained by the difference between the spontaneous endocytosis rates from the somatodendritic and axonal plasma membrane. To test this hypothesis, we followed the kinetics of the insertion of CB1R into the plasma membrane by adapting a BFA-release protocol (Wisco et al., 2003; Fache et al., 2004). BFA reversibly inhibits Arf1-dependent intracellular transport, blocking export of membrane proteins that accumulate in a mixed ER/golgi compartment. After washout of BFA, protein trafficking resumes in a synchronized manner, inducing a “pulse” of protein export and targeting to their functional subcellular compartments.

Neurons were thus transfected with FCB1-eGFP for 3 h, treated overnight with BFA (0.5–0.75 $\mu\text{g/ml}$), then allowed to resume protein trafficking by washing out BFA in the presence of vehicle or inverse agonist AM281 (10 μM), and fixed at different times after washout (Fig. 7A). Live staining of surface receptors was performed by rapid incubation with anti-FLAG antibody preceding fixation and staining with secondary antibody. Transfected neurons were then systematically searched and classified according to the distribution of surface CB1R (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material) (see Materials and Methods).

In control cells with no BFA block, 78% of transfected neurons exhibit axonal distribution of CB1R (Fig. 7B). Immediately after BFA washout, all neurons treated with BFA overnight exhibit intracellular accumulation of CB1Rs. Strikingly, between 4 and 8 h after BFA washout, a significant proportion of neurons is observed exhibiting uniform (35%) and somatodendritic surface staining (23%). Twenty-four hours after washout, CB1R surface distribution approaches the distribution observed in untreated neurons, with a majority of neurons displaying a predominantly axonal distribution (67%). This transient appearance of CB1Rs on the somatodendritic surface suggests that CB1Rs are not directly targeted to axons but are rather nonspecifically sent toward the entire neuronal plasma membrane. Thus, most of them appear first on the somatodendritic membrane from where they are subsequently removed by constitutive endocytosis, whereas receptors reaching the axonal surface are maintained on the plasma membrane. Accordingly, if the BFA washout is followed by incu-

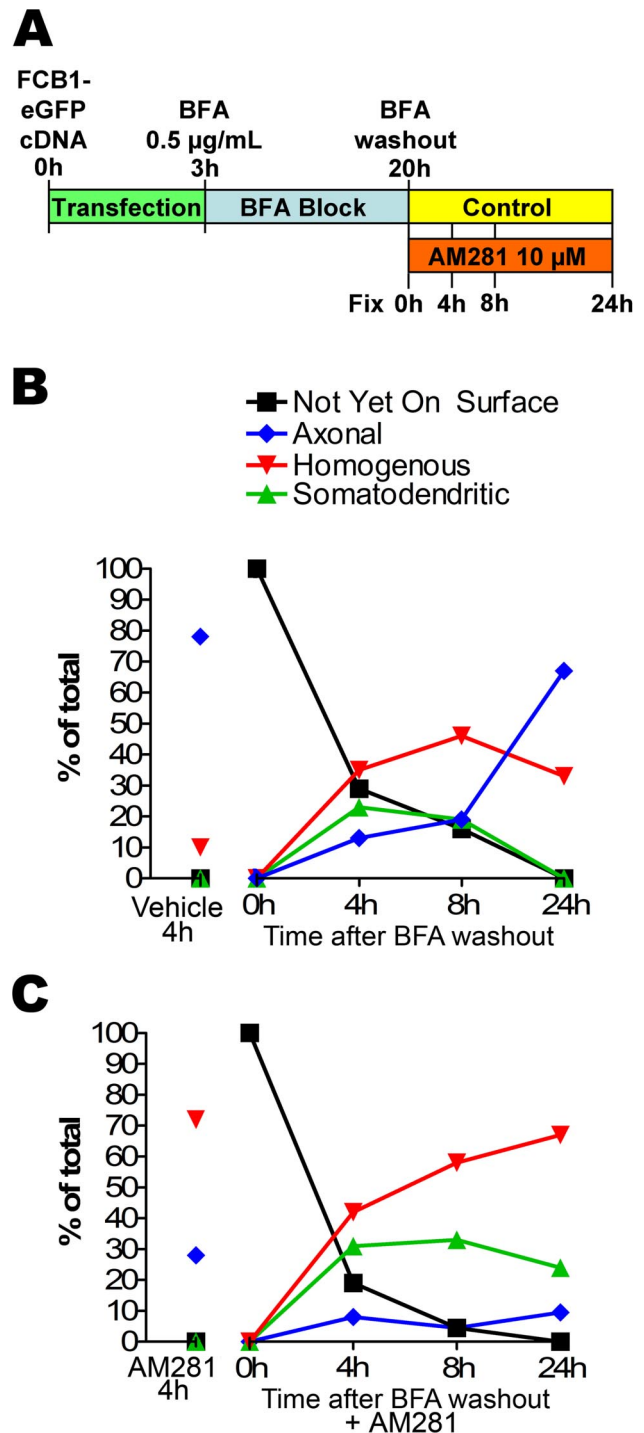


Figure 7. Time course of CB1R insertion in the neuronal plasma membrane. **A**, Diagram of the time course experiment. DIV 8 neurons are transfected with FCB1-eGFP for 3 h incubation in transfection medium. They are then incubated overnight with 0.5–0.75 $\mu\text{g/ml}$ BFA to block protein export from the golgi. After extensive washes (BFA washout), neurons are incubated in either regular medium or in the presence of 10 μM AM281 for 0, 4, 8, and 24 h. At these time points, they are labeled for surface CB1Rs and fixed. The proportion of each category is determined for each condition and time point ($n = 50$ –150 neurons in each of two independent experiments leading to comparable results). **B**, Time course of CB1R surface targeting in control conditions. Just after BFA washout (0 h), no CB1R is present at the neuronal plasma membrane. Then, a transient appearance of somatodendritic surface CB1Rs (at 4 and 8 h) precedes establishment of the proper axonal distribution (after 24 h). This shows that CB1R is likely to be first inserted in the somatodendritic plasma membrane before being endocytosed and sent to the axon. **C**, Time course of CB1R surface targeting in the presence of 10 μM AM281. Interestingly, the inverse agonist sequesters CB1Rs that transit on the somatodendritic plasma membrane, thus inhibiting emergence of the axonal surface distribution of CB1R (majority of “somatodendritic” and “uniform” phenotypes 24 h after BFA washout in the presence of AM281).

bation with inverse agonist AM281, the final surface distribution of CB1R is reversed (Fig. 7C). Although CB1R appears 4 h after washout on the somatodendritic surface, subsequent endocytic elimination is impaired, leading to neurons displaying mostly uniform and somatodendritic distributions 24 h after washout (67 and 24%, respectively). These results show that most CB1Rs transiently appear on the somatodendritic plasma membrane before reaching the axon and that inverse agonist AM281 blocks this mechanism by sequestering CB1Rs on the somatodendritic plasma membrane. Thus, constitutive activity is the driving force of CB1R elimination from the somatodendritic plasma membrane and is necessary for the establishment of axonal polarity observed for surface CB1Rs.

Discussion

We have investigated spontaneous and ligand-induced intracellular translocation of CB1R in cultured hippocampal neurons to examine how an important property of this receptor, constitutive activity, might influence receptor function through regulation of its subneuronal localization. Our results indicate that neuronal CB1Rs are constitutively activated in the somatodendritic compartment of neurons. This constitutive activity results in a permanent cycle of endocytosis and recycling, leading to a predominantly intracellular localization in the somatodendritic compartment at steady state. Pharmacological or molecular blockade of this somatodendritic cycle disrupts axonal polarization of CB1R. Thus, the somatodendritic, constitutive activity-driven endosomal pathway supplies axons with CB1Rs and provides a unique mechanistic link between receptor pharmacology and functional targeting.

Somatodendritic cycle of endocytosis and recycling

We have previously described that in non-neuronal cells, constitutive activity of CB1Rs results in a permanent cycle of endocytosis and recycling (Leterrier et al., 2004). A growing body of evidence indicates that this behavior is likely a general phenomenon for constitutively active GPCRs (Whistler et al., 2002; Fourgeaud et al., 2003; Leterrier et al., 2004; Marion et al., 2004; Morris et al., 2004). However, these results were obtained in heterologous expression systems, so the physiological relevance of this phenomenon remains unknown. To our knowledge, no physiological role has been proposed for this cycling either. Our present data suggests that constitutive endocytosis and recycling between plasma membrane and endosomes is relevant to describe the behavior of endogenous CB1Rs in the somatodendritic compartment of neurons. In our study, two experimental results show the constitutive endocytosis of CB1Rs in neurons. First, in the somatodendritic compartment, CB1Rs are present in intracellular vesicles as also reported previously (Katona et al., 1999; Coutts et al., 2001). Second, these endosomal receptors have an endocytic origin as shown by the antibody-feeding experiments.

Constitutive somatodendritic endocytosis of CB1R was found to follow the clathrin-dependent endocytosis pathway, similarly to endocytosis of other neuronal GPCRs like neurokinin NK1 receptor (Schmidlin et al., 2001), but not mGluR5 (Fourgeaud et al., 2003). Indeed, endocytosed CB1Rs colocalized extensively with cotransfected clathrin. Moreover, inhibition of clathrin-mediated endocytosis by acute depletion of plasma membrane cholesterol (MBCD), as well as cotransfection with dominant-negative mutants of eps15, dynamin1, dynamin2, and rab5, impaired spontaneous endocytosis of CB1Rs, as indicated by its upregulation on the somatodendritic plasma membrane.

Importantly, inverse agonist AM281 also interrupts spontane-

ous CB1R endocytosis by sequestering both transfected and endogenous receptors on the somatodendritic plasma membrane. If we interpret inverse agonist action as stabilization of an inactive conformation of the receptor (Milligan and Bond, 1997), this is a strong indication that CB1Rs are constitutively activated in the somatodendritic compartment of neurons. The source of constitutive activation for somatodendritic CB1Rs could result from the well documented intrinsic constitutive activity of CB1R (Bouaboula et al., 1997; Pan et al., 1998; Rinaldi-Carmona et al., 1998) but also from endocannabinoids present in the culture medium. However, control experiments measuring agonist-induced endocytosis of CB1-eGFP in HEK293 cells incubated with supernatant medium from neuronal cultures did not detect significant endocannabinoid-induced CB1R endocytosis (unpublished results), in line with the results of Pan et al. (1998) who did not detect endocannabinoid effects on calcium currents in dorsal root ganglia neuronal cultures. Formal exclusion of endocannabinoid effects is difficult though, because of the lack of proven neutral antagonists for the CB1R (i.e., ligands that antagonize agonist binding without influencing receptor conformational equilibrium).

The last step in the constitutive cycle involves constitutive recycling of CB1R from endosomes to the plasma membrane. The effects of MBCD and AM281 suggest that there is a constant supply of CB1Rs that bring receptors to the plasma membrane allowing upregulation of the surface population, via inhibition of CB1R endocytosis. As the effects take place after short-term treatment (30 min and 3 h, respectively), these receptors are unlikely to be neosynthesized receptors but rather recycled receptors, like is the case in HEK293 cells (Leterrier et al., 2004).

In axons of differentiated neurons, CB1Rs accumulate on the plasma membrane

Strikingly, the axonal CB1R population behaves quite differently. Our observations using live-cell surface immunolabeling followed by fluorescent optical or electron microscopy confirm previous findings (Coutts et al., 2001), showing that expression of CB1Rs gradually increases on the axonal surface as neurons mature and diminishes slowly even after prolonged agonist treatment. Agonist-induced endocytosis of surface CB1Rs is complete after 16 h (Coutts et al., 2001), and axonal surface CB1Rs are not upregulated after inverse agonist treatment. On the contrary, in the somatodendritic compartment, our data show that CB1R endocytosis is rapid and complete after 3 h, similarly to other cell types like HEK293 cells (Leterrier et al., 2004) or other heterologous expression systems (Rinaldi-Carmona et al., 1998; Hsieh et al., 1999). This suggests the presence of a less effective endocytic machinery for CB1Rs in axons compared with the somatodendritic compartment. This slow rate of endocytosis could constitute the limiting factor that induces sequestration of CB1Rs on the plasma membrane and is in fact supported by description of differential endocytic pathways in somatodendritic and axonal compartments (Mundigl et al., 1993). A detailed EM study by Parton et al. (1992) showed that in axons, early endosomes were found only in presynaptic terminals and in varicosities but not in the axonal shaft, suggesting that axonal endocytosis is restricted to the presynaptic sites. Indeed, these authors have shown that internalization of fluid-phase markers was significantly reduced in mature axons, as compared with immature axons or to the somatodendritic membrane. Thus, CB1R traffic proceeds differently in the axonal and somatodendritic compartments, with retention at the axonal plasma membrane and selective elimination

through constitutive endocytosis from the somatodendritic surface.

Axonal targeting through constitutive activity-dependent somatodendritic endocytosis

The above considerations lead us to propose a simple mechanism of CB1R targeting based on its constitutive activity and the difference between endocytosis rates in the axonal and somatodendritic compartments. Newly synthesized receptors are delivered to both neuronal compartments, followed by elimination from the somatodendritic membrane because of constitutive activity-dependent endocytosis. The same constitutive activity leads to significantly reduced endocytosis from the axonal membrane, because of the lower endocytic capacity of mature axons. Multiple cycles of endocytosis and recycling thus lead to a gradual sequestration of receptors on the axonal plasma membrane. This model (supplemental Fig. 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material) requires two well segregated membrane compartments, which is likely the case in neurons, where a diffusion barrier at the axonal initial segment prevents axonal and somatodendritic membrane proteins to mix (Winckler et al., 1999; Nakada et al., 2003). This model is supported by our kinetic data obtained using time-resolved analysis of CB1R distribution after BFA washout, a procedure that facilitates the observation of postgolgi protein transport. First, newly synthesized receptors accumulate in the first hours on the somatodendritic plasma membrane. Second, significant axonal polarization of CB1Rs is only achieved after 24 h. Third, blockade of constitutive activity-dependent somatodendritic endocytosis of CB1R by inverse agonist AM281 also prevents proper axonal polarization of surface CB1Rs, leading to a nonpolarized distribution or even to reversal of the polarized distribution of surface CB1Rs. Interestingly, this model also implies that a substantial proportion of CB1Rs expressed on the axonal plasma membrane have been transcytosed from the somatodendritic plasma membrane.

Selective somatodendritic elimination, together with axonal retention as a targeting mechanism, was recently proposed for a chimera protein consisting of the cytoplasmic tail of the axonal sodium channel Nav1.2 fused to a reporter protein (Garrido et al., 2001), as well as for VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), a synaptic vesicle V-SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (Sampo et al., 2003), and NgCAM (neuron–glia cell adhesion molecule) (Wisco et al., 2003). Despite important common characteristics, there is a fundamental difference between these targeting models and the model we propose for CB1R: the aforementioned studies identified static intracellular motifs recognized by the somatodendritic endocytic machinery, whereas CB1R endocytosis is caused by reversible adoption of an active conformation by the receptor. In other words, the axonal targeting information in the above models is encoded in the primary structure of the proteins, whereas for CB1R it is coded in the tertiary structure.

In conclusion, in this report we (1) show the implication of compartment-selective endocytosis in the axonal targeting of CB1R, (2) identify intracellular pathways involved in neuronal endocytosis of CB1R, (3) propose a general mechanism of axonal retention, the reduced endocytic capacity of mature axons, and (4) perhaps most importantly, show that for the GPCR CB1R, the driving force of axonal targeting is the pharmacologically active state of the receptor. The validation of the constitutive activity-dependent axonal targeting cycle for axonal receptors other than CB1R would possibly enhance our understanding of the physiology and physiopathology for several therapeutically important

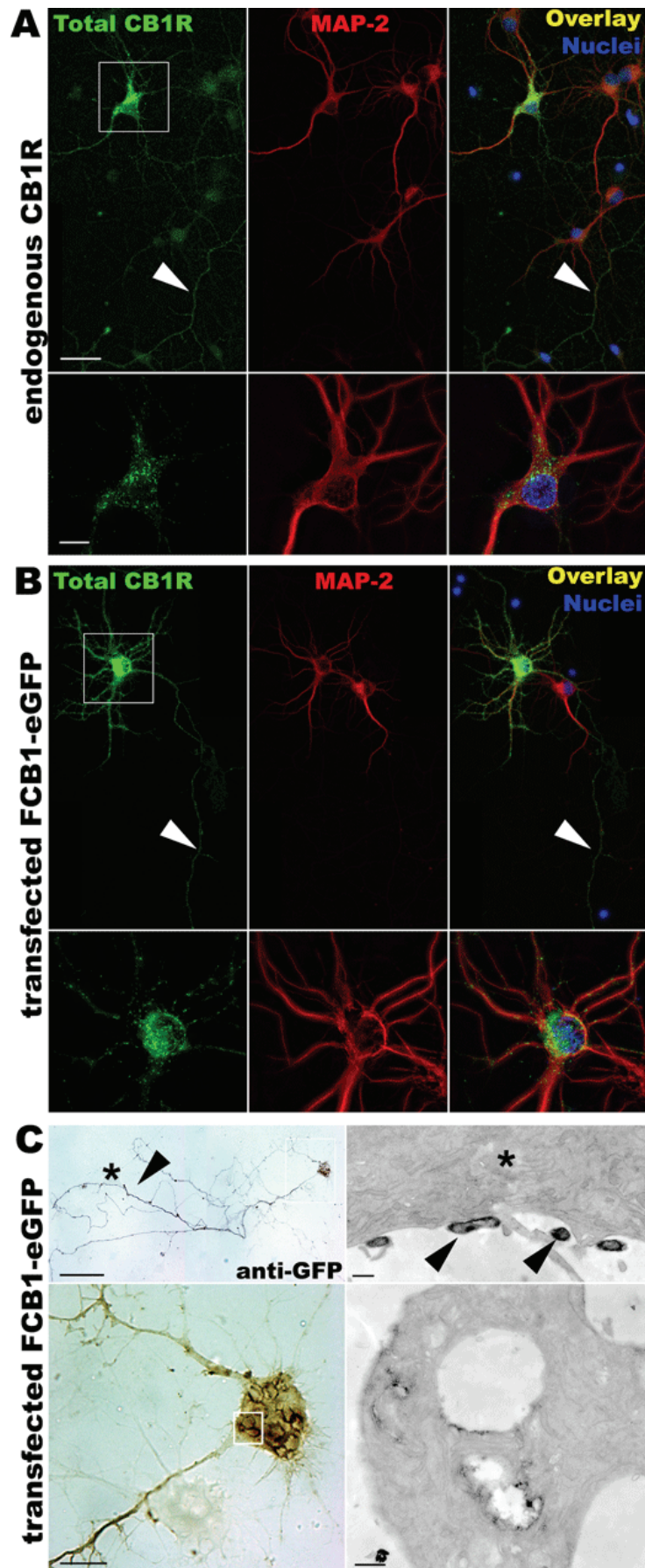
neurotransmitter systems, and could also provide an additional pharmacodynamical framework (i.e., interference with axonal targeting) to interpret the chronic effects of inverse agonist drugs.

References

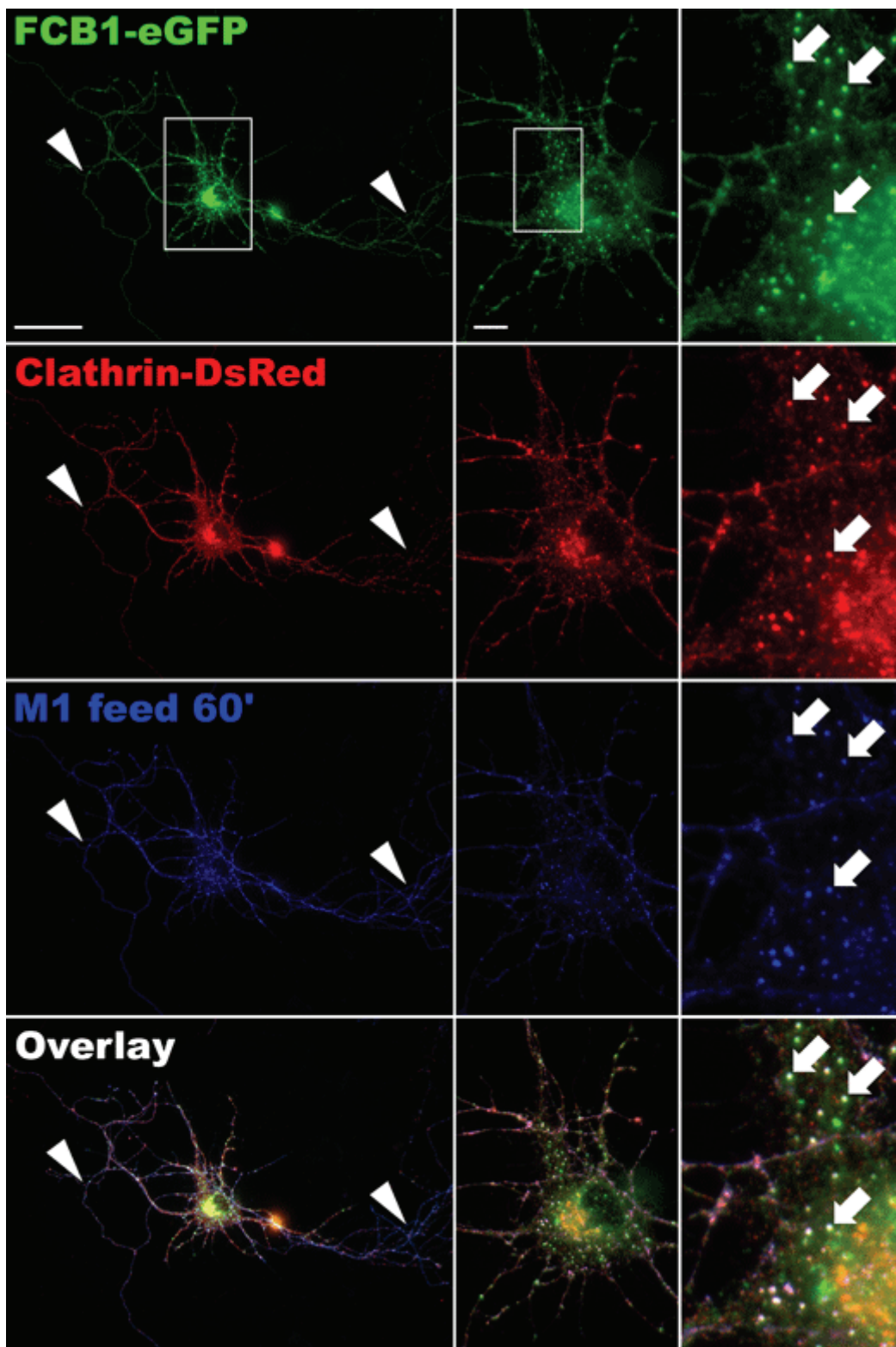
- Benmerah A, Poupon V, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A (2000) Mapping of Eps15 domains involved in its targeting to clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 275:3288–3295.
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 272:22330–22339.
- Cao H, Garcia F, McNiven MA (1998) Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 9:2595–2609.
- Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, Irving AJ (2001) Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21:2425–2433.
- de Ligt RA, Kourounakis AP, Ijzerman AP (2000) Inverse agonism at G-protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol* 130:1–12.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454–1468.
- Engqvist-Goldstein AE, Warren RA, Kessels MM, Keen JH, Heuser J, Drubin DG (2001) The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly *in vitro*. *J Cell Biol* 154:1209–1223.
- Fache MP, Moussif A, Fernandes F, Giraud P, Garrido JJ, Dargent B (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J Cell Biol* 166:571–578.
- Fletcher TL, De Camilli P, Banker G (1994) Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J Neurosci* 14:6695–6706.
- Fourgeaud L, Bessis AS, Rossignol F, Pin JP, Olivo-Marin JC, Hemar A (2003) The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway. *J Biol Chem* 278:12222–12230.
- Garrido JJ, Fernandes F, Giraud P, Mouret I, Pasqualini E, Fache MP, Jullien F, Dargent B (2001) Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *EMBO J* 20:5950–5961.
- Gifford AN, Tang Y, Gately SJ, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1997) Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett* 238:84–86.
- Goslin K, Banker G (1990) Rapid changes in the distribution of GAP-43 correlate with the expression of neuronal polarity during normal development and under experimental conditions. *J Cell Biol* 110:1319–1331.
- Goslin K, Asmussen H, Banker G (1998) Rat hippocampal neurons in low-density cultures. In: *Culturing nerve cells*, Ed 2 (Banker G, Goslin K, eds), pp 339–370. Cambridge, MA: MIT.
- Guan XM, Kobilka TS, Kobilka BK (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J Biol Chem* 267:21995–21998.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161–202.
- Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K (1999) Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 73:493–501.
- Jolimay N, Franck L, Langlois X, Hamon M, Darmon M (2000) Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT_{1B} receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* 20:9111–9118.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544–4558.
- Kenakin T (2004) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65:2–11.
- Leterrier C, Bonnard D, Carrel D, Rossier J, Lenkei Z (2004) Constitutive

- endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J Biol Chem* 279:36013–36021.
- Marion S, Weiner DM, Caron MG (2004) RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *J Biol Chem* 279:2945–2954.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564.
- Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58:167–176.
- Milligan G (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G-protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64:1271–1276.
- Milligan G, Bond RA (1997) Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends Pharmacol Sci* 18:468–474.
- Miserey-Lenkei S, Parnot C, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002) Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem* 277:5891–5901.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408:860–864.
- Morris DP, Price RR, Smith MP, Lei B, Schwinn DA (2004) Cellular trafficking of human α 1a-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol Pharmacol* 66:843–854.
- Mundigl O, Matteoli M, Daniell L, Thomas-Reetz A, Metcalf A, Jahn R, De Camilli P (1993) Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J Cell Biol* 122:1207–1221.
- Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T, Kusumi A (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5:626–632.
- Nyiri G, Cserep C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136:811–822.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1998) SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca²⁺ currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol Pharmacol* 54:1064–1072.
- Parton RG, Simons K, Dotti CG (1992) Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J Cell Biol* 119:123–137.
- Pertwee RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76:1307–1324.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639–650.
- Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le Fur G (1998) Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 287:1038–1047.
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37:611–624.
- Schmidlin F, Dery O, DeFea KO, Slice L, Patierno S, Sternini C, Grady EF, Bunnett NW (2001) Dynamin and Rab5a-dependent trafficking and signaling of the neurokinin 1 receptor. *J Biol Chem* 276:25427–25437.
- Seachrist JL, Ferguson SS (2003) Regulation of G-protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* 74:225–235.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6775–6780.
- Whistler JL, Gerber BO, Meng EC, Baranski TJ, von Zastrow M, Bourne HR (2002) Constitutive activation and endocytosis of the complement factor 5a receptor: evidence for multiple activated conformations of a G-protein-coupled receptor. *Traffic* 3:866–877.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698–701.
- Wisco D, Anderson ED, Chang MC, Norden C, Boiko T, Folsch H, Winckler B (2003) Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 162:1317–1328.

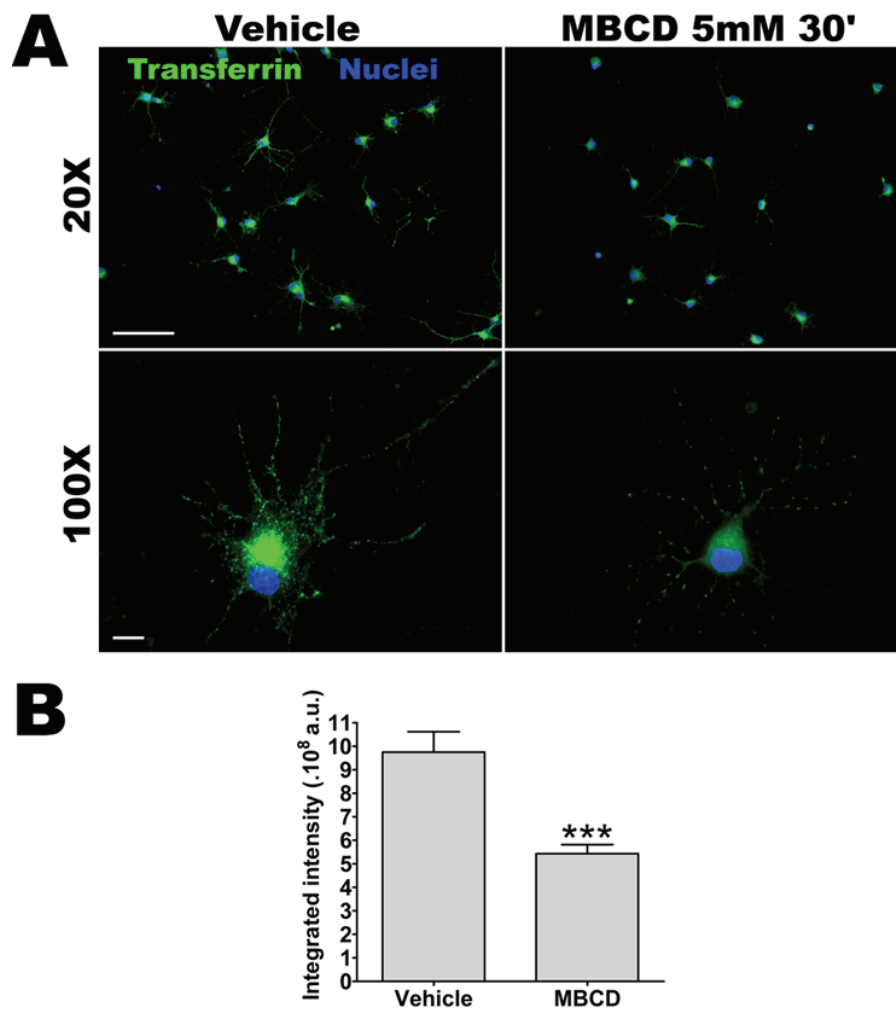
Supplemental Figure 1



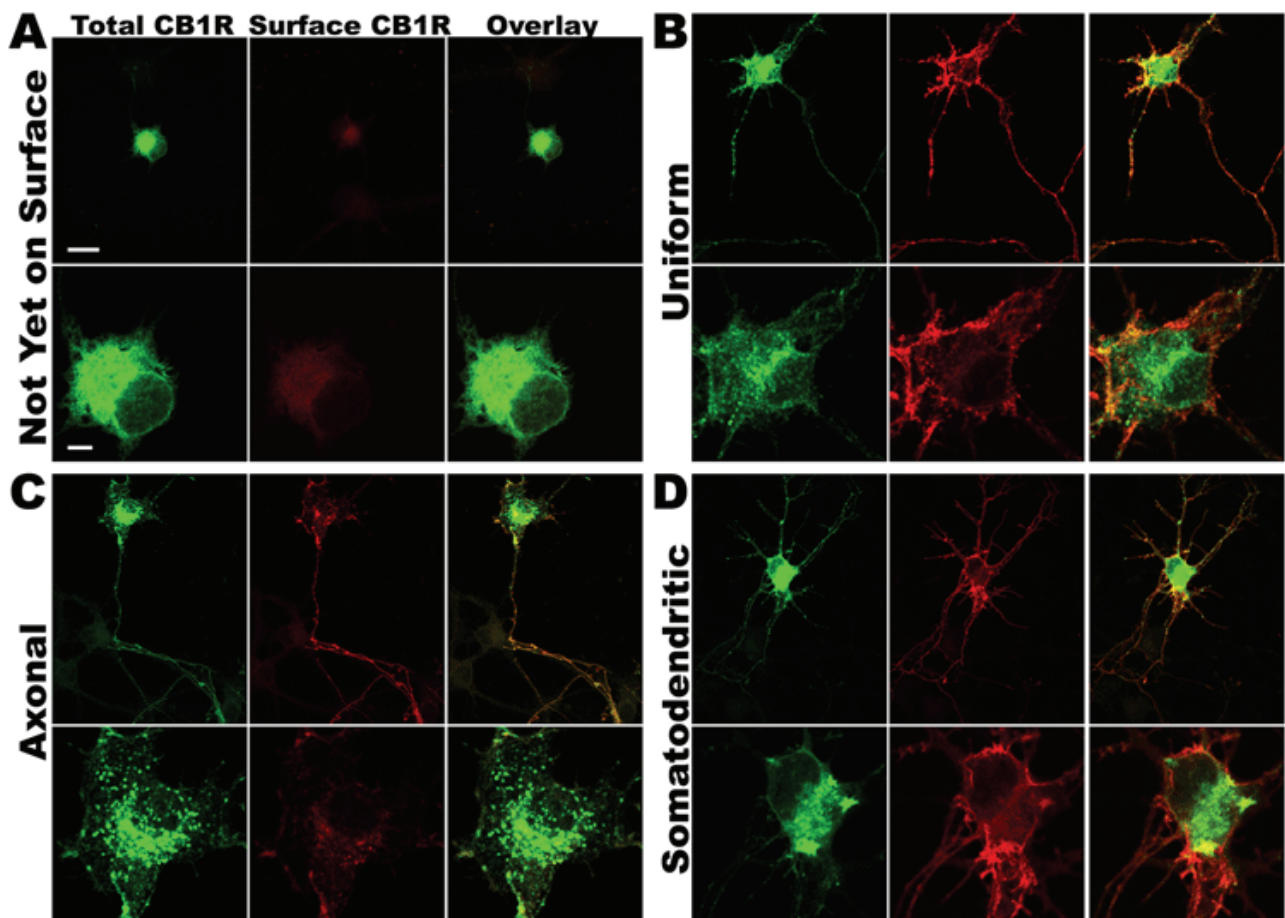
Supplemental Figure 2



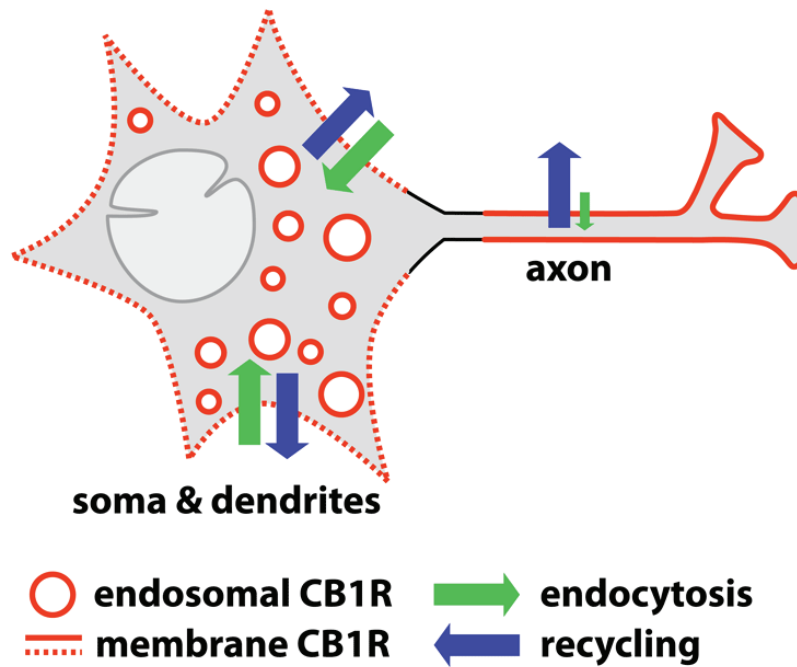
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



2.4 Discussion

Nous avons étudié la distribution subcellulaire et le trafic du récepteur cannabinoïque CB1 dans les neurones d'hippocampe en culture, en examinant le récepteur exprimé de manière endogène par une sous-population des neurones ainsi que le comportement de récepteurs transfectés dans les neurones. Le récepteur CB1 est constitutivement actif dans les neurones, et ceci provoque un cycle constitutif d'endocytose/recyclage dans le compartiment somatodendritique, localisant la plus grande partie des récepteurs CB1 dans les endosomes. Ce cycle étant absent dans le compartiment axonal, la distribution de surface du récepteur CB1 est axonale, et l'établissement et le maintien de cette distribution polarisée nécessitent l'activité constitutive et la présence du cycle endocytique somatodendritique. Je voudrais à présent discuter plusieurs questions abordées par cette partie de notre travail : approfondir certains points de la discussion de l'article, et la compléter par de nouvelles perspectives. La question de la validité de ces résultats sera abordée, notamment la restriction de l'expression du récepteur CB1 à certain sous-types neuronaux et sa distribution précise à la membrane axonale. Nous nous interrogerons ensuite sur l'activité constitutive des récepteurs CB1 dans l'axone et les raisons du maintien de ces récepteurs à la membrane axonale, avant d'étudier dans quelle mesure les résultats obtenus pour le récepteur CB1 sont susceptibles d'être généralisés à d'autres récepteurs et protéines membranaires axonales.

2.4.1 Récepteur CB1 et sous-types neuronaux

Les cultures de neurones d'hippocampe embryonnaires de rat que nous avons utilisées contiennent en grande majorité des neurones pyramidaux glutamatergiques, dont les caractéristiques morphologiques sont similaires à celles observées *in vivo* (Banker and Cowan, 1979). Cependant, ces cultures contiennent également une minorité de neurones GABAergiques correspondants aux interneurones présents dans l'hippocampe *in vivo*. Ces neurones représentent environ 6 % de l'ensemble des neurones en culture et possèdent une morphologie distincte (Benson et al., 1994). D'après nos observations par double marquage de CB1 et de l'enzyme de synthèse du GABA, GAD65, les neurones positifs pour CB1 sont GABAergiques, ce qui est cohérent avec la spécificité d'expression du récepteur CB1 dans les neurones GABAergiques positifs pour la cholecystokinine (CCK) *in vivo* (Katona et al., 1999). La transfection des cultures d'hippocampe n'a pas de tropisme visible pour les neurones GABAergiques ou glutamatergiques : étant donnée la faible proportion de ces derniers et la très faible efficacité de la transfection des neurones, la majorité des neurones transfectés par le récepteur FCB1-eGFP sont des neurones pyramidaux glutamatergiques, ce que

l'on peut vérifier en examinant la morphologie des neurones présentés sur les figures de l'article 2. On peut donc légitimement s'interroger sur la pertinence des résultats obtenus grâce à des récepteurs transfectés dans des neurones qui ne les expriment pas dans des conditions normales, *in vivo* ou *in vitro*. Cependant, nous abordons l'étude du récepteur CB1 par un angle de biologie cellulaire et considérons que nous sommes en présence de mécanismes (endocytose, rétention, adressage axonal...) communs à l'ensemble des phénotypes neuronaux. Ainsi, il n'y a pas de différence dans la distribution et le trafic induit par les ligands entre les récepteurs CB1 endogènes et les récepteurs transfectés, malgré cette différence de sous-type neuronal de leurs hôtes. Plus généralement, aucune différence entre les différents sous-types neuronaux n'a été, à ce jour, caractérisée en ce qui concerne les mécanismes de trafic intracellulaire généraux : les différences observées entre les neurones excitateurs et inhibiteurs résident seulement dans l'organisation des compartiments synaptiques. Les déterminants du trafic d'autres protéines spécifiques des neurones GABAergiques comme l'enzyme GAD65 (Kanaani et al., 2002) ou le transporteur GAT1 (Farhan et al., 2004) ont été étudiés par la même stratégie de transfection, sans que les caractéristiques de leur adressage ou de leur compartimentalisation ne soient affectées. Il paraît donc raisonnable de considérer que le trafic du récepteur CB1 n'est pas dépendant du sous-type neuronal, tout en insistant sur la nécessité de valider les résultats obtenus avec les récepteurs endogènes, *in vitro* et *in vivo*.

2.4.2 CB1 : récepteur présynaptique ou axonal ?

Dès le clonage du récepteur CB1 et l'obtention d'anticorps dirigés contre la protéine, le récepteur a été localisé en grandes quantités dans les fibres nerveuses, c'est-à-dire dans les axones. Au-delà de la spécificité des sous-types neuronaux exprimant le récepteur CB1, les premières études de sa localisation au niveau ultrastructural décrivent une localisation restreinte aux terminaux présynaptiques (zone qui entoure la fente synaptique elle-même) (Katona et al., 1999). Dans les cultures d'hippocampe dissociées, les récepteurs CB1 sont détectés à la surface des axones, regroupés en structures ponctuelles qui colocalisent avec les marqueurs des synapses GABAergiques (Irving et al., 2000). Cependant, ces données initiales ont été contrastées et il apparaît que les récepteurs CB1 axonaux sont répartis de manière plus homogène le long des axones, et notamment dans les parties de l'axone dépourvues de connections synaptiques. Ainsi, dans les noyaux de la base, l'intensité de marquage des récepteurs CB1 axonaux est plus grande dans les parties préterminales que dans les terminaux eux-mêmes (Matyas et al., 2006). Dans l'hippocampe, les récepteurs CB1 présents sur les segments axonaux dépourvus de terminaux sont jusqu'à deux fois plus nombreux que ceux présents au niveau des terminaux (Nyiri et al., 2005).

L'exclusivité présynaptique paraît donc davantage une vision partielle de la localisation de CB1 qu'un résultat avéré. Dans nos cultures de neurones hippocampaux, les récepteurs CB1 axonaux ne sont pas regroupés en amas (*clusters*) et la distribution observée est homogène le long de l'axone, en microscopie optique et en microscopie électronique. La révélation du marquage des récepteurs CB1 endogènes à l'or colloïdal montre des grains d'or qui décorent régulièrement certaines fibres axonales (voir la **Figure 1 de l'article 2**). Si l'on détecte les synapses présentes dans nos cultures grâce à un marquage de la synaptophysine, on n'observe pas de colocalisation avec le récepteur CB1 axonal. Cette absence de localisation présynaptique est valable pour des neurones matures entre 8 et 11 DIV, mais également dans des neurones ayant terminé leur maturation (29 DIV). Il paraît donc justifié de parler de CB1 comme récepteur axonal plutôt que présynaptique, et de s'interroger sur le rôle des récepteurs hors des terminaux, là où ils ne peuvent intervenir dans la régulation de la transmission synaptique.

2.4.3 Activité constitutive des récepteurs dans l'axone

Le récepteur CB1 est donc exprimé de manière homogène le long de la membrane axonale, et cette distribution contraste fortement avec celle observée dans le compartiment somatodendritique. Les récepteurs CB1 somatodendritiques cyclent constitutivement entre la membrane et les endosomes, avec une présence fugace à la membrane. On a démontré que cette endocytose rapide des récepteurs CB1 à la surface somatodendritique est causée par l'activité constitutive du récepteur ; dès lors, quel est l'état d'activation du récepteur CB1 à la surface des axones ? Étant donnée la stabilité du récepteur à la membrane axonale, on pourrait imaginer que l'activité constitutive est inhibée dans l'axone, provoquant le maintien du récepteur à la membrane. Ceci pourrait se faire par le biais d'un ancrage par des protéines interagissant avec la partie intracellulaire du récepteur, sur le modèle des ankyrines G modulant la distribution des canaux sodiques au niveau du segment initial de l'axone (Garrido et al., 2001). Cependant, des arguments pharmacologiques nous amènent à penser que l'activité constitutive du récepteur CB1 est conservée dans l'axone, tandis que l'étape d'endocytose subséquente est absente. En effet, les récepteurs CB1 axonaux sont extrêmement stables à la membrane plasmique, et peu sensibles à la présence de ligand modulant leur activité. Notamment, selon nos données concernant le récepteur endogène ou transfecté, l'agoniste WIN n'internalise que partiellement les récepteurs CB1 axonaux après trois heures de traitement. Si le récepteur CB1 était stable à la membrane car inactif, l'agoniste en activant pleinement le récepteur devrait provoquer son internalisation complète et rapide, comme c'est le cas dans les cellules HEK-293 ou dans le compartiment somatodendritique. De plus, si le récepteur CB1 était contraint à une conformation inactive dans l'axone, l'agoniste lui-même aurait

des difficultés à activer le récepteur et à déclencher la signalisation, et on observerait une variation de l'efficacité des ligands agonistes par rapport aux récepteurs CB1 exprimés dans des lignées cellulaires non neuronales. Ce n'est pas le cas si l'on en croit les études examinant la réponse de cultures neuronales aux stimulations du récepteur CB1 (Jung et al., 1997; Breivogel et al., 2004). En réalité, ces hypothèses doivent être vérifiées par des méthodes nouvelles de mesure de l'activité du récepteur CB1 au niveau des axones, afin de connaître l'état précis d'activation, de phosphorylation et de désensibilisation constitutive des récepteurs CB1 axonaux.

2.4.4 Endocytose sélective : capacité d'endocytose moindre de l'axone ?

On favorisera donc l'hypothèse que le récepteur CB1 est constitutivement actif au niveau de l'axone, mais qu'il n'est pas internalisé depuis la membrane axonale. Le déficit d'internalisation axonale de CB1 est montré par nos données sur l'internalisation incomplète après trois heures de traitement par l'agoniste WIN, ainsi que par celles de Coutts et ses collaborateurs (Coutts et al., 2001), qui n'observent la disparition totale des récepteurs CB1 présents à la surface des axones qu'après seize heures d'incubation avec le WIN. Par contraste, l'internalisation du récepteur CB1 est rapide dans le compartiment somatodendritique, avec une population intracellulaire importante internalisée en 1h dans l'expérience d'*antibody feeding*. Cette différence de comportement entre les compartiments somatodendritique et axonal pourrait simplement être expliquée par une capacité d'endocytose réduite dans le compartiment axonal : l'axone est un compartiment hautement spécialisé, qui semble moins compétent que le soma et les dendrites pour l'internalisation des récepteurs CB1. L'étude de l'endocytose de marqueurs a montré que les capacités endocytiques de l'axone sont limitées aux terminaux présynaptiques et aux varicosités (Parton et al., 1992). On peut penser que l'axone possède un circuit d'endocytose très spécialisé qui a évolué pour optimiser le cycle des vésicules synaptiques dans les terminaux. Ce circuit d'endocytose synaptique dépend de la GTPase Rab3 et possède des caractéristiques distinctes de l'endocytose classique, dite « constitutive », médiée par Rab5 (Star et al., 2005). La contrepartie de cette haute spécialisation du compartiment axonal vers l'endocytose synaptique semble être une capacité réduite de l'endocytose constitutive. Il est intéressant de noter que l'axone encore immature est capable d'internaliser le lipide ganglioside GM1 de manière aussi efficace que le compartiment somatodendritique, mais que la maturation de l'axone et l'apparition des compartiments présynaptiques entraînent une diminution importante de ses capacités d'endocytose (Sofer et al., 1996).

Beaucoup d'observations viennent étayer ce constat d'une fonction endocytique plus efficace dans le compartiment somatodendritique que dans le compartiment axonal. Le soma et les dendrites proximales concentrent les circuits de néosynthèse (Golgi, réticulum endoplasmique) ainsi

que les compartiments endosomaux présentant un pH inférieur à 6 (Augenbraun et al., 1993; Overly and Hollenbeck, 1996). Le récepteur à la transferrine TfR, modèle utilisé pour la définition des voies d'endocytose dans les cellules non polarisées, est restreint au compartiment somatodendritique (Cameron et al., 1991; Mundigl et al., 1993). Les compartiments endosomaux traversés par le TfR (West et al., 1997), notamment les étapes bloquées par la bréfeldine A, sont spécifiques au compartiment somatodendritique (Mundigl et al., 1993). Un ensemble de protéines impliquées dans l'endocytose et le recyclage des récepteurs possède une distribution restreinte au compartiment somatodendritique : citons la GTPase Rab11 (Sheehan et al., 1996), la protéine endosomale EEA1 (Wilson et al., 2000), la protéine NEEP21 (Steiner et al., 2002), ou encore la protéine ALS2 (Otomo et al., 2003).

Enfin, un argument plus théorique peut être invoqué : l'axone, en dehors des terminaux et des varicosités, est un compartiment extrêmement fin (diamètre de l'ordre de 200 nm) et allongé (plusieurs centaines de microns), qui présente donc un rapport surface/volume très élevé. L'endocytose d'une protéine membranaire concentrée dans ces parties de l'axone est donc une tâche difficile, surtout dans l'environnement intracellulaire de la tige axonale, riche en microtubules dévolus au transport des vésicules entre les parties proximales et distales de l'axone. Tous ces arguments confortent l'idée qu'un cycle constitutif d'endocytose/recyclage est susceptible d'intervenir dans le compartiment somatodendritique pour le récepteur CB1, tandis que le récepteur axonal reste à la membrane plasmique par manque de capacité endocytique de ce compartiment. Si l'on garde à l'esprit la fonction de désensibilisation que possède l'endocytose des RCPG, ce modèle sous-entend que les voies de signalisations de CB1 sont plus activées de manière spontanée dans l'axone que dans le compartiment somatodendritique, ce qui est compatible avec les données fonctionnelles concernant CB1. Encore une fois, seul le développement de méthodes permettant de mesurer l'activation et l'état de phosphorylation du récepteur *in situ* au niveau axonal permettra de clarifier ce point.

2.4.5 Généralisation du modèle d'adressage par activation constitutive

Avant d'examiner dans quelle mesure les résultats obtenus concernant l'adressage du récepteur CB1 sont généralisables à d'autres récepteurs, je voudrais insister sur l'importance d'adressage axonal par endocytose/rétention sélective. L'adressage somatodendritique direct, par adressage sélectif, est largement soutenu par des arguments expérimentaux (présence de motifs d'adressage, parfois similaires aux motifs d'adressage basolatéraux) et théoriques (présence d'une polarité des microtubules permettant un transport sélectif) (Stowell and Craig, 1999). L'adressage axonal direct est beaucoup moins répandu : les protéines apicales sont généralement exprimées à la

fois à la surface des dendrites et de l'axone (Jareb and Banker, 1998). En 1999, JN Stowell et AM Craig notent, dans leur étude sur l'adressage des récepteurs métabotropiques au glutamate, qu'au moment où ils écrivent toutes les protéines membranaires axonales étudiées jusque-là (environ 50, en comptant les mutants) sont envoyées vers l'axone indirectement, avec un mécanisme de fusion sélective ou d'endocytose sélective (Stowell and Craig, 1999). Cette observation est encore valable aujourd'hui : en particulier, l'adressage de NgCAM, considéré par ces auteurs comme une exception à cette règle d'adressage indirect, a été réévalué par Bettina Winckler et ses collaborateurs, qui ont démontré une endocytose sélective du compartiment somatodendritique (Wisco et al., 2003). On peut donc souscrire au modèle général proposé par B. Winckler et ses collaborateurs (Winckler and Mellman, 1999), stipulant que l'adressage somatodendritique est réalisé par des motifs spécifiques tandis que l'adressage axonal « par défaut » est indirect, par fusion ou rétention sélective. Insistons dans ce modèle sur l'importance de la faible capacité d'endocytose constitutive de l'axone telle que discutée plus haut, qui renforce la pertinence des modèles d'endocytose sélective. Par ailleurs, un modèle basé sur un envoi non sélectif des protéines dans toutes les directions suivi d'une endocytose sélective dans le compartiment somatodendritique a pour conséquence, étant donné l'unicité et le faible diamètre de l'axone, que la plupart des protéines axonales sont passées une ou plusieurs fois à la membrane somatodendritique avant d'être envoyées dans l'axone (Setou et al., 2004). Ainsi dans ce modèle, la plupart des protéines à la membrane de l'axone sont-elles issues d'un mouvement de transcytose, même si ce phénomène n'a pas de caractère obligatoire.

Si les protéines membranaires axonales parviennent dans l'axone après avoir été adressées « au hasard » puis retirées de la membrane somatodendritique par endocytose, on peut penser que dans le cas des récepteurs, les RCPG en particulier, l'activité constitutive aura une influence primordiale sur la localisation du récepteur dans le neurone. En effet, le lien fonctionnel entre l'activité pharmacologique et l'endocytose, par le biais du phénomène de désensibilisation, est clairement établi pour les RCPG. Dans notre étude du trafic de CB1 dans les cellules HEK-293 ainsi que pour les autres récepteurs mentionnés au chapitre précédent, ce lien est démontré entre l'activité constitutive et l'endocytose du récepteur. Dans ce chapitre où nous détaillons notre étude du trafic neuronal de CB1, le lien en aval entre l'endocytose et l'adressage axonal est dévoilé, ce qui constitue une première pour un RCPG. L'originalité fondamentale de ce travail est la liaison des deux extrémités de la chaîne causale, l'activité constitutive et l'adressage axonal : l'agoniste inverse est capable d'interférer avec la polarisation de la distribution du récepteur.

Nous faisons donc l'hypothèse que l'activité constitutive est le générateur de la polarisation axonale de la distribution du récepteur CB1 dans les neurones. Cette hypothèse concerne les récepteurs, exprimés à la membrane axonale, et possédant une activité constitutive. En ce qui concerne les récepteurs somatodendritiques, on peut penser que leur activité constitutive est moindre, et qu'ils portent des motifs d'adressage spécifiques permettant un adressage direct vers la membrane somatodendritique (Horton and Ehlers, 2003), motifs similaires aux motifs classiques d'adressage des protéines membranaires basolatérales dans les cellules épithéliales (**Figure 26**).

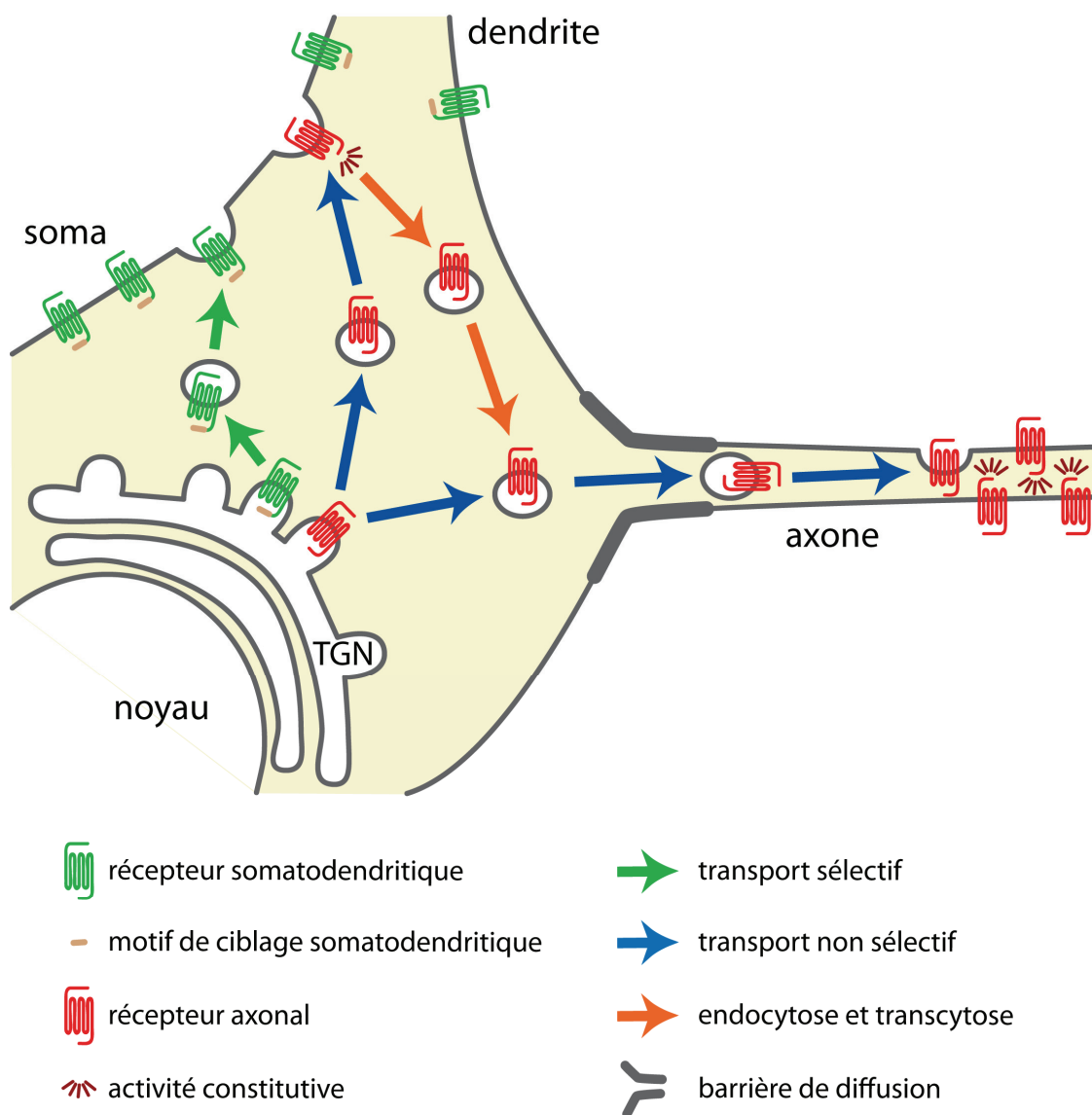


Figure 26 : Modèle de cycle constitutif polarisant

Voici le modèle proposé pour le ciblage des RCPG neuronaux. Les récepteurs possédant une activité constitutive négligeable et un motif de ciblage somatodendritique sont exprimés directement à la surface du soma et des dendrites (en vert). Les récepteurs possédant une activité constitutive (en rouge) sont insérés indifféremment à la membrane somatodendritique ou axonale (flèches bleues), mais sont retirés du soma et des dendrites par endocytose (flèches oranges), à cause de leur activité constitutive (en marron). Les récepteurs ayant gagné l'axone gardent leur activité constitutive à la membrane, mais ce compartiment possède une endocytose moins efficace, autorisant leur maintien à la membrane plasmique axonale.

2.4.6 Généralisation du modèle : cas du récepteur 5-HT_{1B}

Un exemple que je souhaiterais développer concerne les récepteurs de la sérotonine 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}. En effet, ces récepteurs possèdent une combinaison de caractéristiques pharmacologiques et de localisation cellulaire intéressante du point de vue du modèle de cycle constitutif polarisant et de l'adressage des RCPG axonaux. Notre équipe a donc démarré une collaboration avec Michèle Darmon et son équipe à l'UMR 677 du Pr Michel Hamon. Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont principalement exprimés dans les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphe dorsaux et médians (autorécepteurs), et dans les territoires de projection des neurones sérotoninergiques, dans les aires limbiques et dans certaines aires corticales (hétérorécepteurs) (Barnes and Sharp, 1999). Concernant 5-HT_{1B}, la localisation différentielle de l'ARNm et de la protéine avait suggéré une localisation axonale (Boschert et al., 1994), ce qui a été confirmé par microscopie électronique (Riad et al., 2000) et par expression dans les neurones en culture (Ghavami et al., 1999). Le récepteur 5-HT_{1B} est exprimé à la surface des axones, mais au niveau préterminal plutôt que présynaptique, tout comme CB1 (Riad et al., 2000). Par contraste, 5-HT_{1A} est un récepteur localisé exclusivement sur la membrane somatodendritique *in vivo* (Miquel et al., 1991; Riad et al., 2000) et *in vitro* (Ghavami et al., 1999).

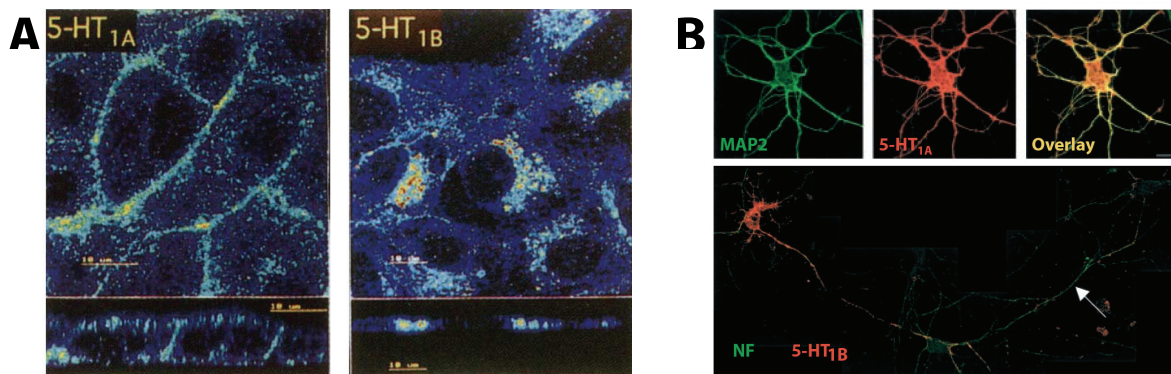


Figure 27 : Distribution subcellulaire des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}

A/ Dans les cellules épithéliales LLC-PK1, le récepteur 5-HT_{1A} est exprimé à la membrane basolatérale (à gauche), tandis que le récepteur 5-HT_{1B} est présent dans des vésicules intracellulaires, ainsi qu'à la membrane apicale (à droite). D'après Darmon et al., 1998.

B/ Dans les neurones d'hippocampe en culture, le récepteur 5-HT_{1A} (en haut, en rouge) est localisé à la membrane somatodendritique, compartiment où est exprimé MAP2 (en vert). Le récepteur 5-HT_{1B} (en bas, en rouge) est exprimé le long de l'axone, comme le montre le marquage avec les neurofilaments de 200 kD (en vert), mais également présent dans le compartiment somatodendritique, avec un marquage qui apparaît intracellulaire. D'après Jolimay et al., 2000.

L'analogie entre la polarisation neuronale et épithéliale a été exploitée par Michèle Darmon et ses collaborateurs, qui ont exprimé 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} dans les cellules épithéliales LLC-PK1 (Langlois et al., 1996). Les récepteurs 5-HT_{1A} sont exprimés à la membrane basolatérale, ce qui est cohérent avec leur localisation somatodendritique dans les neurones, tandis que les récepteurs 5-

HT_{1B} sont majoritairement intracellulaires, avec une population de surface plutôt apicale, à mettre en regard de leur distribution axonale coexistant avec un marquage somatodendritique vésiculaire dans les neurones en culture (Ghavami et al., 1999; Jolimay et al., 2000)(Figure 27). D'élégantes expériences de *domain swapping* menées par l'équipe de Michèle Darmon à l'UMR 677 (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière) ont montré que les domaines responsables de cette différence de polarisation entre les deux récepteurs sérotoninergiques sont localisés dans la troisième boucle intracellulaire et dans la queue carboxyterminale (Darmon et al., 1998; Jolimay et al., 2000).

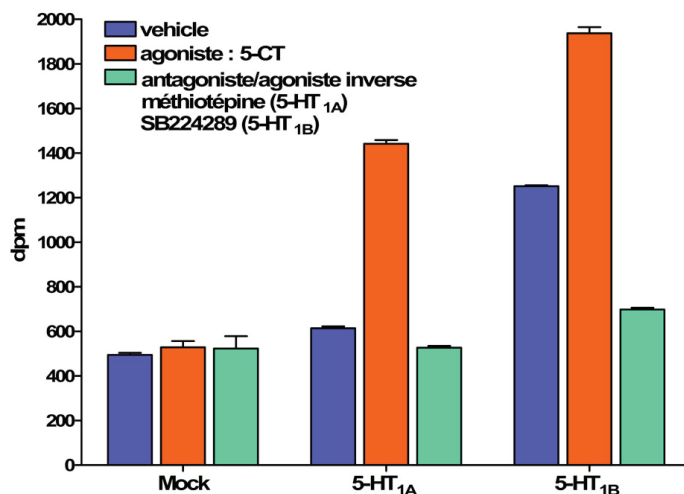


Figure 28 : Activité constitutive des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}

Les récepteurs sont transfectés de manière stable dans les cellules LLC-PK1, et l'activité est testée par ³⁵[S]-GTPγS sur des préparations de membranes. En ordonnées sont rapportées les valeurs brutes de radioactivité des différentes préparations. La présence du récepteur 5-HT_{1A} ne modifie pas l'activité basale (au centre, en bleu), mais l'agoniste 5-CT stimule le récepteur et augmente le couplage (au centre, en rouge). L'antagoniste méthiotépine ne change pas la valeur d'activité basale (au centre, en vert). L'activité basale du récepteur 5-HT_{1B} est importante (à droite, en bleu), et le récepteur peut encore être activé par la 5-CT (à droite, en rouge). Le SB224289 est agoniste inverse, ramenant le couplage du récepteur aux niveaux de base observés pour les cellules non transfectées ou transfectées avec 5-HT_{1A} (à droite, en vert).

Données communiquées par Damien Carrel, UMR 677.

Parallèlement à ces études de la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}, les études pharmacologiques ont détaillé le couplage et la signalisation associés à ces récepteurs, dont la pharmacologie est assez proche de celle du récepteur CB1. Les deux récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont couplés aux protéines G_{i/o}, provoquent l'inhibition de l'adénylate cyclase de type II, inhibent l'activité des canaux calciques et potentialisent les canaux potassiques (Albert and Tiberi, 2001). Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont susceptibles de présenter une activité constitutive (Albert et

al., 1999; Seifert and Wenzel-Seifert, 2002), dans des modèles d'expression hétérologues comme les cellules CHO (Newman-Tancredi et al., 2000; Cosi and Koek, 2001) ou HEK-293 (Albert et al., 1999). Dans les cellules épithéliales LLC-PK1, le récepteur 5-HT_{1A} présente une activité constitutive limitée, tandis que le récepteur 5-HT_{1B} possède une activité constitutive importante, capable d'être inhibée par l'agoniste inverse SB224289 (données communiquées par Damien Carrel, **Figure 28**). Il semblerait donc qu'une différence existe dans l'activité constitutive des deux récepteurs, le récepteur 5-HT_{1B} axonal présentant une activité constitutive significative.

Marc Biard, au sein de notre équipe, a utilisé la méthode SCOP pour étudier le trafic intracellulaire des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}. Les fusions 5-HT_{1A}-eGFP et 5-HT_{1B}-eGFP, exprimées dans les cellules HEK-293, présentent une distribution très différente : 5-HT_{1A}-eGFP est exprimé à la membrane plasmique, tandis que 5-HT_{1B}-eGFP présente une distribution vésiculaire intracellulaire, similaire à celle observée dans les cellules LLC-PK1 (Langlois et al., 1996) (**Figure 29A**). La quantification en terme de rapport récepteur de surface (S)/récepteur cytoplasmique (C) a été effectuée, et le ratio S/C de 5-HT_{1B} est similaire à celui de CB1 (autour de 0,2). Le récepteur peut être internalisé par l'agoniste sumatriptan, et externalisé par l'agoniste inverse SB22489, suggérant la présence d'un cycle constitutif. Cette externalisation peut être inhibée par la monensine, montrant l'implication du recyclage dans l'effet de l'agoniste inverse (**Figure 29B**). L'inhibition de l'endocytose par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) externalise également le récepteur, tandis que l'incubation avec la monensine seule a tendance à accumuler les récepteurs dans les compartiments intracellulaires (**Figure 29C**). L'ensemble de ces résultats montre que le récepteur 5-HT_{1B} constitutivement actif est engagé dans un cycle d'endocytose/recyclage similaire à celui de CB1, tandis que le récepteur 5-HT_{1A}, sans doute dépourvu d'activité constitutive, est exprimé à la membrane plasmique.

La réunion de l'ensemble de ces résultats se résume ainsi : le récepteur 5-HT_{1B} est constitutivement actif dans les lignées cellulaires, et présente un cycle constitutif d'endocytose/recyclage dans les cellules HEK-293. Dans les neurones, le récepteur est exprimé dans des vésicules somatodendritiques et à la surface de l'axone. Examiné sous l'angle du cycle constitutif polarisant découvert pour le récepteur CB1, on peut avancer que le récepteur 5-HT_{1B} est exprimé à la surface des axones grâce au même mécanisme. Le récepteur 5-HT_{1A} possède quant à lui une activité constitutive plus limitée, est stable à la membrane dans les cellules HEK-293 et présente une distribution somatodendritique membranaire dans les neurones : ce récepteur proche de 5HT_{1B} mais possédant une activité constitutive plus faible renforce la démonstration du rôle de l'activité constitutive dans l'adressage axonal des RCPG.

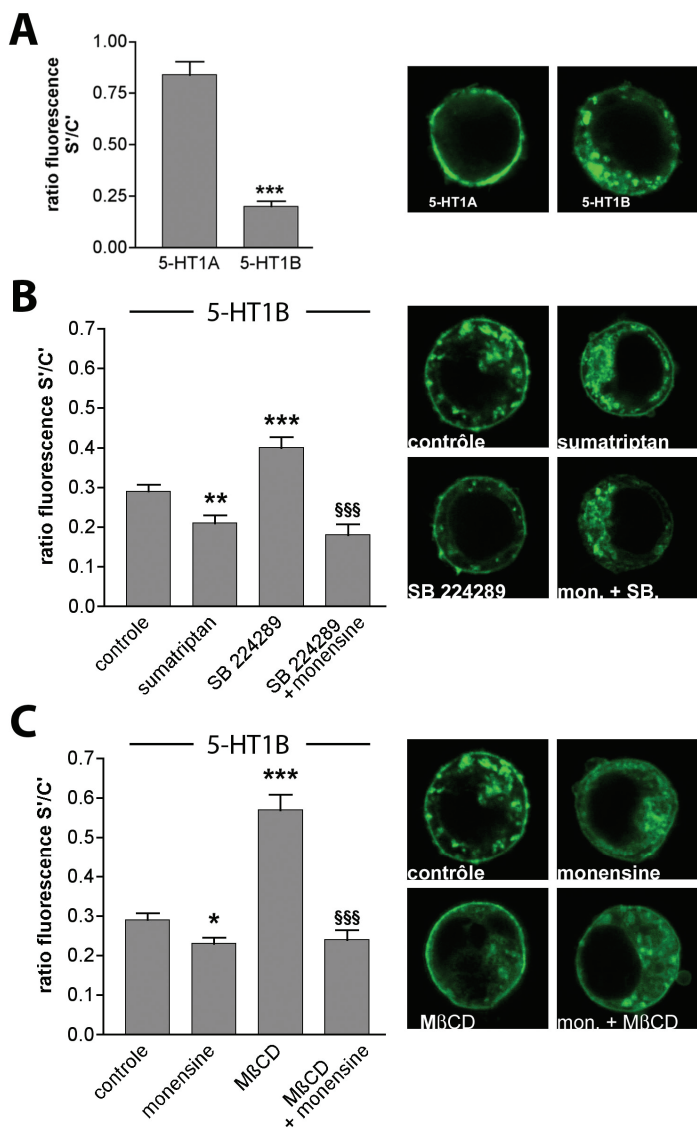


Figure 29 : Cycle constitutif d'endocytose/recyclage de 5-HT_{1B} dans les cellules HEK-293

Les cellules HEK-293 sont transfectées de manière transitoire avec 5-HT_{1A}-eGFP et 5-HT_{1B}-eGFP, et la distribution des récepteurs est visualisée et quantifiée selon la méthode SCOP (Letierrier et al., 2004).

A/ Distributions de 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} en absence de ligand. 5-HT_{1A} est exprimé à la membrane plasmique, tandis que 5-HT_{1B} est majoritairement intracellulaire, ce qui se traduit par un ratio S/C plus faible.

B/ Effet des ligands sur la distribution de 5-HT_{1B}. Les traitements sont appliqués pendant 3h. L'agoniste sumatriptan à 1 μM provoque une internalisation de 5-HT_{1B} (diminution du S/C), tandis que l'agoniste inverse SB224289 à 1 μM externalise les récepteurs (augmentation du S/C). Cette externalisation est inhibée par l'inhibiteur du recyclage monensine (70 nM).

C/ Effet de l'inhibition du recyclage et de l'endocytose sur la distribution de 5-HT_{1B}. La monensine à 70 nM pendant 3h accumule le récepteur 5-HT_{1B} dans les endosomes (diminution du S/C), tandis que le traitement par la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) pendant 1h externalise les récepteurs (augmentation du S/C). La coapplication des deux traitements ne change pas l'équilibre entre les récepteurs membranaires et intracellulaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1 Interprétations

1.1 Principaux résultats

Dans ce travail, nous avons examiné les relations entre l'activité constitutive du récepteur CB1 et son trafic intracellulaire, en termes d'équilibre surface/intracellulaire dans les cellules HEK-293, puis en termes d'adressage somatodendritique/axonal dans les neurones d'hippocampe. L'activité constitutive est manipulable par le biais de ligands du récepteur CB1 permettant d'activer les récepteurs (ligand agoniste) ou de les inactiver (ligand agoniste inverse). Dans les cellules HEK-293 exprimant le récepteur CB1-eGFP, le récepteur est majoritairement présent à l'intérieur de la cellule dans des compartiments endosomaux, avec une population restreinte (environ 15 % des récepteurs CB1 totaux) exprimée à la membrane plasmique. Cette situation est le résultat de l'équilibre d'un cycle d'endocytose/recyclage spontané et permanent du récepteur CB1. Ce cycle constitutif est dépendant de l'activité constitutive du récepteur, car le traitement avec l'agoniste inverse externalise l'ensemble des récepteurs CB1 à la membrane plasmique. Ce cycle constitutif suit une voie de trafic classique, avec une endocytose dépendante de la clathrine et un trafic intracellulaire dépendant de Rab5 et Rab4.

Dans les neurones d'hippocampe en culture, l'ensemble des expériences, réalisées grâce à l'expression endogène du récepteur CB1 et la transfection de constructions CB1-eGFP, montre que le cycle d'endocytose/recyclage du récepteur CB1 est présent dans le compartiment somatodendritique des neurones, mais pas dans le compartiment axonal. Il en résulte un état d'équilibre caractérisé par une expression membranaire importante du récepteur CB1 le long des axones, combinée avec une présence du récepteur au niveau des endosomes somatodendritiques, et une expression à la surface somatodendritique limitée. Le cycle endocytique somatodendritique dépend de l'activité constitutive du récepteur CB1, car l'agoniste inverse est capable d'externaliser les récepteurs des endosomes vers la membrane somatodendritique. De plus, la polarisation axonale de l'expression de surface du récepteur CB1 dépend du cycle endocytique somatodendritique, comme démontré par l'effet de protéines mutantes, partenaires de l'endocytose de CB1 (esp15, dynamines, Rab5), sur l'adressage axonal du récepteur. La dépendance directe entre la polarisation

axonale et l'activité constitutive a été montrée grâce à une expérience de cinétique d'export après blocage BFA : en conditions contrôle, le récepteur apparaît transitoirement à la surface du soma et des dendrites avant de se concentrer dans l'axone. En présence de l'agoniste inverse, cette population à la surface somatodendritique devient stable et l'établissement de la polarisation axonale de la distribution du récepteur est perturbé.

Nos premiers résultats ont conduit à la publication d'un article dans le *Journal of Biological Chemistry* en août 2004. Il s'agissait de la première caractérisation détaillée de l'endocytose et du trafic intracellulaire d'un récepteur sauvage possédant une activité constitutive importante. La seconde partie de nos résultats a été acceptée pour publication dans le *Journal of Neuroscience*. Cet article regroupe plusieurs résultats originaux : description, pour un RCPG, d'un cycle constitutif d'endocytose/recyclage généré par l'activité constitutive dans des cellules neuronales, rôle de ce cycle dans l'établissement d'une distribution axonale du récepteur, et rôle fondamental de l'activité constitutive du récepteur dans son adressage axonal. En outre, les résultats obtenus pour le récepteur CB1 semblent généralisables à plusieurs autres récepteurs axonaux, comme le récepteur sérotoninergique 5-HT_{1B}, ce qui nous amène à proposer un modèle d'adressage axonal des RCPG basé sur l'activité constitutive.

1.2 Particularité des récepteurs axonaux

Le paradigme classique décrit l'activation d'un RCPG par un ligand agoniste suivie de sa désensibilisation, de son endocytose et de son recyclage éventuel. Cependant, la présence de RCPG exprimés sur les tiges axonales comme le récepteur cannabinoïque CB1, le récepteur sérotoninergique 5-HT_{1B} ou dopaminergique D2 représente un défi à cette vision classique. En effet, la tige axonale ne semble posséder ni l'espace, ni la machinerie nécessaire à la mise en place d'un tel fonctionnement. Si les récepteurs axonaux devaient être ramenés dans le soma après leur activation afin de pouvoir être pris en charge par la machinerie endocytaire permettant leur recyclage, cela représenterait un coût énergétique prohibitif étant donné la longueur typique d'un axone. De même, si le fonctionnement était basé sur des récepteurs « jetables », qui ne sont pas recyclés, il faudrait ramener les récepteurs dans le soma après leur activation unique, pour procéder à la dégradation dans les lysosomes et protéasomes. De plus, les données métaboliques suggèrent que les protéines axonales ont une durée de vie très longue, de l'ordre de plusieurs jours dans les modèles de culture, voire des semaines ou des mois *in vivo*. Dans ce cadre, comment les récepteurs peuvent-ils être refunctionalisés après leur activation sur la tige axonale ? Pour les RCPG présents au niveau des terminaux présynaptiques et des varicosités, il paraît raisonnable de penser que leur

réinitialisation exploite la voie d'endocytose recyclage des vésicules synaptiques. Mais que se passe-t-il pour les récepteurs présents sur la tige axonale, loin des terminaux ?

Pour ces récepteurs de la tige axonale, le paradigme classique semble peu approprié. Plus que de simples interrupteurs, ces récepteurs pourraient être des modulateurs : ils possèdent une signalisation basale conséquente qui peut être modulée de manière bidirectionnelle par la présence de ligands : ces ligands peuvent agir comme molécules activatrices (agonistes), mais également inhibitrices (agonistes inverse). En outre, ces ligands peuvent être des molécules de l'environnement extérieur comme dans la vision classique, mais aussi des lipides ou des protéines présentes dans la membrane plasmique, ou encore des partenaires intracellulaires (protéines de signalisation, de régulation, d'échafaudage, second messagers). Dès lors, le paradoxe de l'utilisation répétée des ces récepteurs axonaux s'évanouit, car la modulation de leur activité est basée sur des phénomènes réversibles qui ne nécessitent pas l'endocytose des récepteurs pour être réinitialisés.

2 Perspectives

2.1 Directions de recherche

Au point où nous a amené ce travail, il est important de dégager les enjeux et les prolongements possibles. Tout d'abord, la base moléculaire du cycle endocytique polarisant doit être fermement établie. Pour cela, il est nécessaire de dégager les motifs et les résidus au sein de la séquence du récepteur qui dirigent son activité constitutive d'une part, son endocytose d'autre part. Par ailleurs, il faut répondre à la question : que se passe-t-il dans l'axone ? La stabilité du récepteur CB1 à la membrane axonale indique clairement une situation particulière qui doit être étudiée sous les différents angles de la régulation des RCPG : signalisation, phosphorylation/désensibilisation, activation, endocytose. Enfin, la description mécanistique, utile si elle est généralisable dans le cadre de modèles de fonctionnement, doit être exploitée dans un but plus large, et nous fournir des indices et des hypothèses sur le rôle biologique de ce récepteur. L'ensemble des objectifs présentés ici est au cœur des projets actuels de l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse, l'équipe Dynamique des Récepteurs Neuronaux (DRN) dirigée par Zsolt Lenkei.

2.2 Étude des déterminants du trafic de CB1

Nous avons décrit le trafic intracellulaire du récepteur CB1, et caractérisé plusieurs de ses partenaires, tels les GTPases Rab. Cependant, la connaissance des déterminants moléculaires de ce trafic reste modeste. La détermination, au sein de la séquence du récepteur CB1, des motifs jouant

un rôle de ce trafic est importante. En effet, dans l'hypothèse optimiste où se dégagent des motifs nécessaires et suffisants, ces séquences consensus permettent de prévoir le comportement d'autres protéines. Citons comme exemple la séquence YXXΦ, ou encore YXXXK, séquence récemment découverte au sein du récepteur PX2 contrôlant son endocytose et son adressage neuronal. Cette séquence est par ailleurs présente dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur CB1 (Chaumont et al., 2004). Selon toute probabilité, les motifs déterminants pour la signalisation et le trafic intracellulaire du récepteur CB1 se trouvent dans la troisième boucle intracellulaire et dans la queue carboxyterminale, domaines des RCPG habituellement impliqués dans ces processus. Nous avons fabriqué des mutants tronqués au niveau de la queue carboxyterminale du récepteur, l'un dépourvu de l'ensemble de la queue carboxyterminale CB1 $\Delta_{417-473}$, l'autre dépourvu des quatorze derniers acides aminés CB1 $\Delta_{460-473}$. La littérature décrit d'une part une affinité inchangée, mais une désensibilisation altérée pour le CB1 $\Delta_{417-473}$ (Jin et al., 1999), d'autre part une absence sélective d'endocytose pour CB1 $\Delta_{460-473}$ (Hsieh et al., 1999). Nous avons constaté que CB1 $\Delta_{417-473}$ n'était pas exporté à la membrane plasmique dans les cellules HEK-293, tandis que le récepteur CB1 $\Delta_{460-473}$ présente un trafic tout à fait similaire au récepteur sauvage, sans modification de son endocytose. La fabrication de récepteurs comportant une troncation entre ces deux points (acides aminés 417 et 460) devrait clarifier le rôle des différentes parties de la queue carboxyterminale dans l'export membranaire et l'endocytose du récepteur CB1.

Une autre avancée serait l'établissement de mutants du récepteur CB1 déficients sélectivement pour l'activité constitutive et l'endocytose, permettant de séparer expérimentalement ces deux phénomènes afin d'en étudier les relations. Nous avons commencé la fabrication d'un set de mutants décrits dans la littérature, présentant une signalisation ou une endocytose altérée. Nous développons également la méthode de *Single Cell Optical Pharmacology* (SCOP) afin de pouvoir tester rapidement de nombreux mutants, ce qui permettrait de cribler des mutants aléatoires. Pour cela, des tests pharmacologiques systématiques de l'activité constitutive du récepteur et de ses mutants sont envisagés, par exemple en utilisant des cellules exprimant un rapporteur de l'activité AMPc de type CRE-luciférase (Bouaboula et al., 1997). Pour la détection du comportement endocytique, les méthodes de cytométrie en flux pour mesurer l'équilibre d'expression des récepteurs entre la surface et les compartiments intracellulaires sont actuellement optimisées par Anne Simon, doctorante au sein de l'équipe DRN. À moyen terme, nous espérons pouvoir réaliser la microscopie automatisée de cellules adhérentes, grâce à la technique de *micro-patterning* cellulaire mise au point par Manuel Théry à l'institut Curie (Théry et al., 2005). Cette technique permet de distribuer des cellules adhérentes de manière régulière et de contrôler leur forme par la

déposition ciblée de molécules d'adhésion. Ceci autorise l'acquisition automatique d'images à fort grossissement de cellules à la forme stéréotypée, facilitant l'analyse automatique de la distribution du récepteur.

Enfin, pour mieux caractériser le comportement pharmacologique du récepteur CB1, il est capital de posséder un antagoniste neutre du récepteur CB1. Plusieurs candidats ont été rapportés (Hurst et al., 2002; Ruiu et al., 2003; Thomas et al., 2004), et nous avons obtenu des échantillons que nous allons tester dans notre système d'expression HEK-293 afin de vérifier leur caractère d'antagonistes neutres avant de les utiliser pour discriminer entre l'activité des agonistes endogènes et l'activité constitutive réelle du récepteur dans un cadre physiologique.

2.3 Que se passe-t-il dans l'axone ?

Dans l'étape suivante, il sera nécessaire d'étudier le récepteur CB1 dans son environnement physiologique, la membrane de l'axone. En effet, ce compartiment cellulaire a développé un degré inédit de polarisation et de spécialisation, ce qui en fait un environnement tout à fait particulier en termes de contenu et de fonction. L'étude du fonctionnement des protéines axonales implique de développer des approches nouvelles, permettant d'accéder à ce compartiment dont la morphologie (combinaison de petit diamètre et de grande longueur) complique la visualisation et l'analyse. Dans le domaine des récepteurs, la « pharmacologie axonale » reste un domaine à inventer, dont le but sera l'analyse *in situ* des propriétés pharmacologiques des récepteurs et de leur ligand dans l'axone.

Concernant CB1, il sera d'abord important d'étudier comment les motifs et les résidus décisifs pour l'activité constitutive et l'endocytose modulant l'adressage du récepteur à l'axone. Ensuite, il faudra essayer de caractériser l'état du récepteur CB1 axonal. En ligne avec les connaissances actuelles sur les RCPG, cette description doit prendre en compte trois processus dont la visualisation et la mesure dans le compartiment axonal représentent des défis : l'état d'activité du récepteur en termes de conformation active ou inactive, la signalisation associée à cette activité, et enfin l'état de phosphorylation du récepteur, dont dépend sa désensibilisation.

2.4 État d'activation

Jusqu'à récemment, la mesure de l'activité d'un RCPG ne pouvait se faire qu'en aval du récepteur lui-même, l'étape mesurable la plus précoce étant la liaison des protéines G (technique du $^{35}\text{[S]GTP}\gamma\text{S}$). La mesure directe de l'activation d'un RCPG a été mise au point par l'équipe de Martin Lohse à l'université de Wurtzbourg (Lohse et al., 2003). Grâce à l'insertion de deux fluorophores, la Cyan Fluorescent Protein (CFP) au sein de la troisième boucle intracellulaire et la

Yellow Fluorescent Protein (YFP) au bout de la queue carboxyterminale, la mesure du changement de conformation par FRET s'est révélée possible. Cette méthode a permis la mesure des cinétiques d'activation du α_2 AR (Vilardaga et al., 2003) et du récepteur de l'hormone parathyroïde PTHR (Castro et al., 2005), et a été améliorée par l'utilisation de sondes de type FIAsh (*fluorescent arsenical hairpin binder*) (Hoffmann et al., 2005). En collaboration avec Martin Lohse, nous voulons fabriquer un récepteur CB1 contenant la CFP et la YFP afin de mesurer par FRET l'état d'activation constitutive du récepteur. Un résultat encourageant est la capacité de cette méthode à détecter l'inactivation d'un récepteur constitutivement actif (mutant du récepteur α_2 AR) par un agoniste inverse (Vilardaga et al., 2005). Si nous pouvons mesurer l'activité constitutive de CB1 grâce à cette méthode, il sera possible de visualiser l'état d'activation du récepteur dans des neurones transfectés, et de voir si cet état est différent dans le compartiment somatodendritique et dans les axones.

Une autre stratégie possible est la génération d'anticorps recombinant spécifiques de la conformation active ou inactive du récepteur. Pour cela, une collaboration a été initiée avec Frank Perez de l'institut Curie, et des travaux préliminaires ont été réalisés par Damien Bonnard au sein de l'équipe DRN. La technique de *phage display* avec des bibliothèques codant pour 10^{10} à 10^{12} anticorps différents a permis l'obtention d'anticorps contre la forme active, liée au GTP, de Rab6 (Nizak et al., 2003). Ces anticorps sont des svFv, fragments monomériques hypervariables dont la séquence est connue. Ils n'interfèrent pas avec le fonctionnement GTPase de Rab6, et peuvent être transfectés en fusion avec la GFP pour détecter les protéines cibles « de l'intérieur ». L'obtention d'anticorps spécifiques aux conformations actives et inactives du récepteur peut se faire grâce à un crible de la banque de phages sur des cellules HEK-293 transfectées avec CB1-eGFP, dont la conformation est choisie par incubation avec l'agoniste ou l'agoniste inverse. Ces anticorps recombinants permettraient la transfection de fusions ScFV-GFP dans les neurones, afin de détecter sélectivement les récepteurs actifs, et de visualiser si les récepteurs axonaux sont constitutivement actifs.

2.5 Signalisation axonale

En aval de l'état d'activation, la signalisation du récepteur CB1 emprunte de nombreuses voies différentes, comme cela a été rappelé en introduction. Dans les neurones, les voies de signalisation les mieux documentées sont la modulation de l'AMPC (Jung et al., 1997), et l'activation de la voie des MAP kinases ERK (Derkinderen et al., 2003). Nous voulons essayer de détecter l'activation de ces voies dans les axones des neurones en culture. En ce qui concerne

l'AMPc, des sondes fluorescentes basées sur le FRET, appelées AKAR, permettent de mesurer l'activité des adénylates cyclases et la concentration en AMPc (Zhang et al., 2001). En ce qui concerne l'activité des MAP kinases, la clé d'une détermination de la signalisation distinctes dans les compartiments axonal et somatodendritique est l'obtention de cultures compartimentées où l'on peut séparer physiquement les axones, afin d'utiliser des approches biochimiques qui discriminent les deux compartiments. Ceci est possible grâce aux chambres dites de Campenot (Campenot, 1977; Karten et al., 2005) ou grâce à un nouveau dispositif microfluidique récemment développé (Taylor et al., 2005). L'arrivée au laboratoire de Vincent Studer, spécialiste de la microfluidique appliquée à la biologie, devrait permettre de mettre au point rapidement un tel dispositif au sein du laboratoire.

2.6 Phosphorylation et désensibilisation

Les résultats obtenus montrent que le récepteur CB1 est peu internalisé dans l'axone. Si comme nous le pensons, il est malgré tout constitutivement actif, il serait intéressant de savoir s'il est également la cible d'une désensibilisation ou d'autres phénomènes constitutifs de phosphorylation permettant de moduler son activité. Pour cela, Anne Simon a commencé à mettre au point la purification du récepteur, permettant son analyse par spectrométrie de masse. La présence d'une équipe spécialisée et de spectromètres de grande sensibilité au laboratoire (MALDI TOF/TOF, FTICR) permet d'envisager l'analyse des patterns globaux de phosphorylations de CB1. Les résultats pourront être validés dans les systèmes cellulaires par la fabrication de mutants des résidus sérine/thréonine impliqués, ainsi que par l'obtention d'anticorps phosphospécifiques permettant l'étude de la distribution des phosphorylations en fonction des compartiments cellulaires et de l'état d'activation du récepteur (Pollok-Kopp et al., 2003). L'utilisation de dispositifs microfluidiques de culture compartimentée permettra d'obtenir une analyse différentielle des phosphorylations du récepteur CB1 présentes au niveau axonal et somatodendritique.

2.7 Rôles du récepteur CB1 axonal

Ces informations précises sur l'activation, la régulation et l'adressage du récepteur CB1, permettront de mieux comprendre le fonctionnement des récepteurs axonaux, utilisant le récepteur CB1 comme modèle. La « pharmacologie axonale », en tant que nouveau domaine de recherche, bénéficiera des avancées technologiques et conceptuelles développées lors de l'étude de ce récepteur. Cela permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'œuvre au sein du mystérieux compartiment axonal. Plus prosaïquement, ces informations mécanistiques sur le comportement de CB1 fourniront sans doute des indices importants sur le rôle physiologique de ce récepteur. En effet,

l'implication de récepteurs CB1 présynaptiques dans le phénomène de *Depolarization-induced Suppression of Inhibition* (DSI) ne doit pas obérer le fait que la plus grande partie des récepteurs ne sont pas situés au niveau présynaptique. Des efforts importants sont déployés par l'équipe Dynamique des Récepteurs Neuronaux afin de cerner et d'étudier ces nouveaux rôles du récepteur cannabinoïque CB1.

ANNEXES MÉTHODOLOGIQUES

1 Culture des neurones d'hippocampe embryonnaire de rat

1.1 Culture de cellules gliales de cortex de rats nouveau-nés

1.1.1 Milieux

Milieu de dissection 500 mL

DMEM (500 mL Gibco 41965-062)

10 mM HEPES pH 7.4 (5 mL HEPES 1 M Gibco 15630-056)

Milieu de dissociation 10 mL

9 mL HBSS sans Ca, Mg (Gibco 14170-088)

0.5 mL HEPES 1 M (Gibco 15630-056)

250 µL Trypsine 1 % (aliquots 250 µL -20 °C)

650 µL DNase type I (aliquots 650 µL -20 °C)

Aliquots :

Trypsine 1 % dans H₂O milliQ filtré (100mg Sigma T9935)

DNaseI 1 % dans H₂O milliQ filtré (100mg Roche 104159)

Arrêt de la dissociation

2x500 µL BSA 1 % (aliquots 500 µL)

Aliquots :

BSA 1 % dans H₂O milliQ filtré (1g Sigma A4161)

Milieu de culture de glies 500 mL

500 mL DMEM (Gibco 41965-062)

50 mL Sérum de Veau Fœtal (SVF) inactivé 30 min à 54 °C (Gibco 10108-165, aliquot 50 mL)

500 µL Pénicilline-Streptomycine (PS, Gibco 15140-122)

Filtré

1.1.2 Dissection et dissociation

Dissection de six à dix cerveaux de rats Sprague-Dawley nouveau-nés (P1-P4) : les rats sont sacrifiés au fur et à mesure de la dissection, chaque cerveau est disséqué dans une nouvelle Pétri 60 mm remplie de milieu de dissection. Disséquer les cortex sans méninges, les réunir dans une Pétri 60 mm contenant du milieu de dissection.

Le reste de la manipulation se déroule sous hotte de culture cellulaire. Transférer les cortex avec une pipette 10 mL dans un tube 50 mL (le transfert coupe les cortex en morceaux), compléter à 50 mL avec du HBSS sans Ca/Mg.

Centrifuger 30 s à 1000 rpm, aspirer le surnageant, ajouter 50 mL de HBSS sans Ca/Mg, centrifuger à nouveau 30 s à 1000 rpm, aspirer le surnageant. Ces deux lavages servent à enlever le Ca/Mg et à diluer les contaminations éventuelles.

Ajouter les 10 mL de milieu de dissociation, répartir dans deux Pétri 60 mm et laisser 15 min à 37 °C dans l'incubateur. Préparer une pipette Pasteur cotonnée stérile rodée à la flamme (pas trop fine)

À la fin des 15 min, ajouter 500 µL de BSA 1 % par boîte pour inhiber la trypsine et transférer le tout dans un tube 50 mL. Dissocier avec une pipette 5 mL, 10 aller-retour et si ce n'est pas suffisant, dissocier avec la pipette Pasteur rodée (10 aller-retour en dissociant par parties de 1 à 2 mL dans un tube 15 mL). Mettre les cellules dissociées dans un tube 50 mL contenant 35 mL de milieu de culture (DMEM 10 % SVF PS). Regarder si des filaments d'ADN sont présents et ajouter une ou deux gouttes de DNase le cas échéant. Mélanger.

Centrifuger 30 s à 1000 rpm pour éliminer les morceaux non dissociés. Reprendre le surnageant dans un tube 50 mL, centrifuger ce surnageant 10 min à 1000 rpm. Si le surnageant est encore trouble, refaire une étape de resuspension/centrifugation : vider le surnageant, resuspendre dans 50 mL de milieu de culture (vérifier l'absence de filaments d'ADN), centrifuger 10 min à 1000 rpm.

Vider le surnageant, reprendre dans 1 mL de milieu de culture, homogénéiser, rajouter 15 mL de milieu de culture. Compter les cellules avec la cellule de Mallassez. Ajuster le mélange de cellules dissociées à 1-2 millions de cellules par mL (en général cela correspond à 32 mL de milieu de

culture pour six cerveaux disséqués). Préparer des boîtes 150-162 cm² avec 25 mL de milieu de culture. Mettre 8 mL de mélange de cellules dissociées (8 millions de cellules) par boîte.

1.1.3 Culture

Le lendemain, l'allure de la culture est horrible, c'est normal ! Changer le milieu impérativement. Les cultures arriveront à confluence 7 à 12 jours plus tard, les passer alors à la moitié. Après ce passage (N1) elles pourront être utilisées pour conditionner le milieu de culture des neurones.

L'obtention de cellules gliales de bonne qualité est déterminante pour la culture de neurones. Une bonne culture de glies présente des cellules de morphologies différentes : types fibroblastes plats et étendus, petites cellules rondes, petites cellules étoilées... L'idéal est d'avoir quatre ou cinq phénotypes différents. Lors de la mise en présence du milieu de culture des neurones (dépourvu de sérum), les cellules plates de morphologie fibroblastiques deviennent plus ramifiées : c'est l'activation. Au fur et à mesure des passages, le type fibroblastique (cellules gliales non activées) va devenir de plus en plus majoritaire. Après quatre à cinq passage, ces cellules seront quasiment seules dans la culture : c'est le signe qu'il faut utiliser des nouvelles cultures de cellules gliales !

Le sérum utilisé pour les cultures de glies doit permettre aux glies de pousser à un bon rythme, et de produire les nutriments nécessaires au conditionnement du milieu de culture des neurones. Il faut donc tester le sérum du milieu de culture des glies pour l'ensemble de la manip (culture de glies + conditionnement du milieu des neurones + pousse et transfection des neurones).

1.2 Culture des neurones d'hippocampe embryonnaires de rat

1.2.1 Milieux

Milieu de dissection 500 mL

DMEM (500 mL Gibco 41965-062)

10 mM HEPES pH 7,4 (5 mL HEPES 1 M Gibco 15630-056)

Milieu de dissociation 2 mL

2 mL HBSS sans Ca, Mg (Gibco 14170-088)

125 µL HEPES 0.5 M (Gibco 15630-056)

65 µL Trypsine 1 % (aliquots 250 µL -20 °C)

65 µL DNase type I (aliquots 650 µL –20 °C)

Aliquots :

Trypsine 1 % dans H₂O milliQ filtré (100mg Sigma T9935)

DNaseI 1 % dans H₂O milliQ filtré (100mg Roche 104159)

Arrêt de la dissociation

180 µL BSA 1 % (aliquots 300 µL)

Aliquots :

BSA 1 % dans H₂O milliQ filtré (1g Sigma A4161)

Milieu de culture de neurones neurobasal complet NB+ 100 mL

A faire chaque semaine (durée de vie limitée)

98 mL Neurobasal (Gibco 21103-049)

2 mL Supplément B27 (Gibco 17504-044)

250 µL Glutamax I (Gibco 35050-038, aliquots 1 mL)

125 µL Pénicilline-Streptomycine (PS, Gibco 15 140-122, aliquots 1 mL)

Filtré (Stericup 150 mL)

1.2.2 Préparation des lamelles et du milieu (la veille)

Préparation de lamelles propres

Placer une centaine de lamelles (CLM Menzel Gläser 12 mm LC012) dans un bécher de 100 mL remplie d'éthanol absolu (important ! l'éthanol 96° contient des traces d'eau susceptibles de coller les lamelles ensemble après le séchage). Sceller avec du parafilm et placer sur un roller pour la nuit. Le lendemain, remplacer l'éthanol et replacer sur le roller pour la nuit. Le surlendemain, étaler les lamelles dans une grande boîte de Pétri en verre et passer au four à 200-220 °C pendant 2 à 4 h. Laisser refroidir sous la hotte et transférer dans un récipient hermétique.

Coating à la polylysine

Préparer une solution de poly-D-lysine 200 µg/mL en diluant dans de l'eau la poly-D-lysine déshydratée 5 mg (Sigma P7280 5mg) dans 25 mL d'eau milliQ stérile. Placer des lamelles propres dans des boîtes 4 puits (VWR Nunc 1340101) et déposer 400 µL de solution diluée de poly-D-lysine par puits. Laisser les lamelles sous la hotte pendant 2 h ou les placer dans l'incubateur pour la nuit. Après le coating, rincer 2 fois avec 500 µL d'eau milliQ stérile puis 1 fois avec du PBS de

culture cellulaire. Si ceci est fait la veille de la culture (coating de deux heures), placer les lamelles dans le PBS à l'incubateur jusqu'au lendemain.

Conditionnement du milieu

La veille de la culture, après avoir préparé du Neurobasal complet (NB+), le conditionner en plaçant 30 mL de NB+ par boîte T162 de cellules gliales (au moins à 50 % de confluence).

Quantités

Le plus souvent pour une culture, je prépare 32 à 40 lamelles coatées, 100 mL de NB+ dont 60 mL sont conditionnés dans deux T162 de glias. Les 40 mL restant servent pour le dépôt des neurones après la dissociation. La dissection nécessite entre 8 et 12 embryons ce qui amène entre 2 et 5 millions de neurones, répartis à 60000-80000 par lamelle.

1.2.3 Dissection

Rats Sprague-Dawley embryonnaires : E17-E19 en comptant E0 pour le jour après l'accouplement. En général, dissection le mardi à E18 donc commande d'une ratte gestante accouplée du jeudi au vendredi deux semaines avant. Préparer une Pétri 60 mm, des Pétri 35 mm (deux de plus que le nombre d'embryons à disséquer) remplies de milieu de dissection sur glace.

La ratte gestante est sacrifiée par décapitation, puis les embryons sont prélevés après ouverture du ventre, en faisant attention à ne pas inciser les intestins (source de contamination). Le chapelet d'embryons est placé dans une Pétri 100 mm. Les embryons sont extraits du sac placentaire et leurs têtes sont prélevées **(1)** et placées dans la Pétri 60 mm sur glace (**Figure 30**, photos **1-2-3-4**).

L'extraction du cerveau se fait dans la Pétri 35 mm ayant servi à disséquer le cerveau précédent (ou une nouvelle Pétri si c'est le premier). Ceci se fait sous la loupe pour l'éclairage, même si un grossissement n'est pas vraiment nécessaire. Le crâne est maintenu grâce aux pinces fines plantées au niveau des yeux (**Figure 30**, **5**). Avec les ciseaux fins, découper l'arrière du crâne en biais (découpe **(1)**, **Figure 30**, **6-7-8**). Extraire le cerveau en appuyant avec le manche d'une pince sur le sommet du crâne à côté des pinces de maintien (**Figure 30**, **9**). Le cerveau sort progressivement par l'arrière (**Figure 30**, **10**), procéder doucement pour ne pas l'endommager.

Transférer le cerveau dans une nouvelle Pétri 35 mm. Les étapes suivantes se font sous la loupe avec grossissement. Placer le cerveau de manière à le voir de dessus. Détacher les hémisphères (**Figure 30, 13**) en découpant d'abord à l'arrière **(1)** puis au centre à l'avant **(2)**, pour accéder à la partie profonde **(3)**.

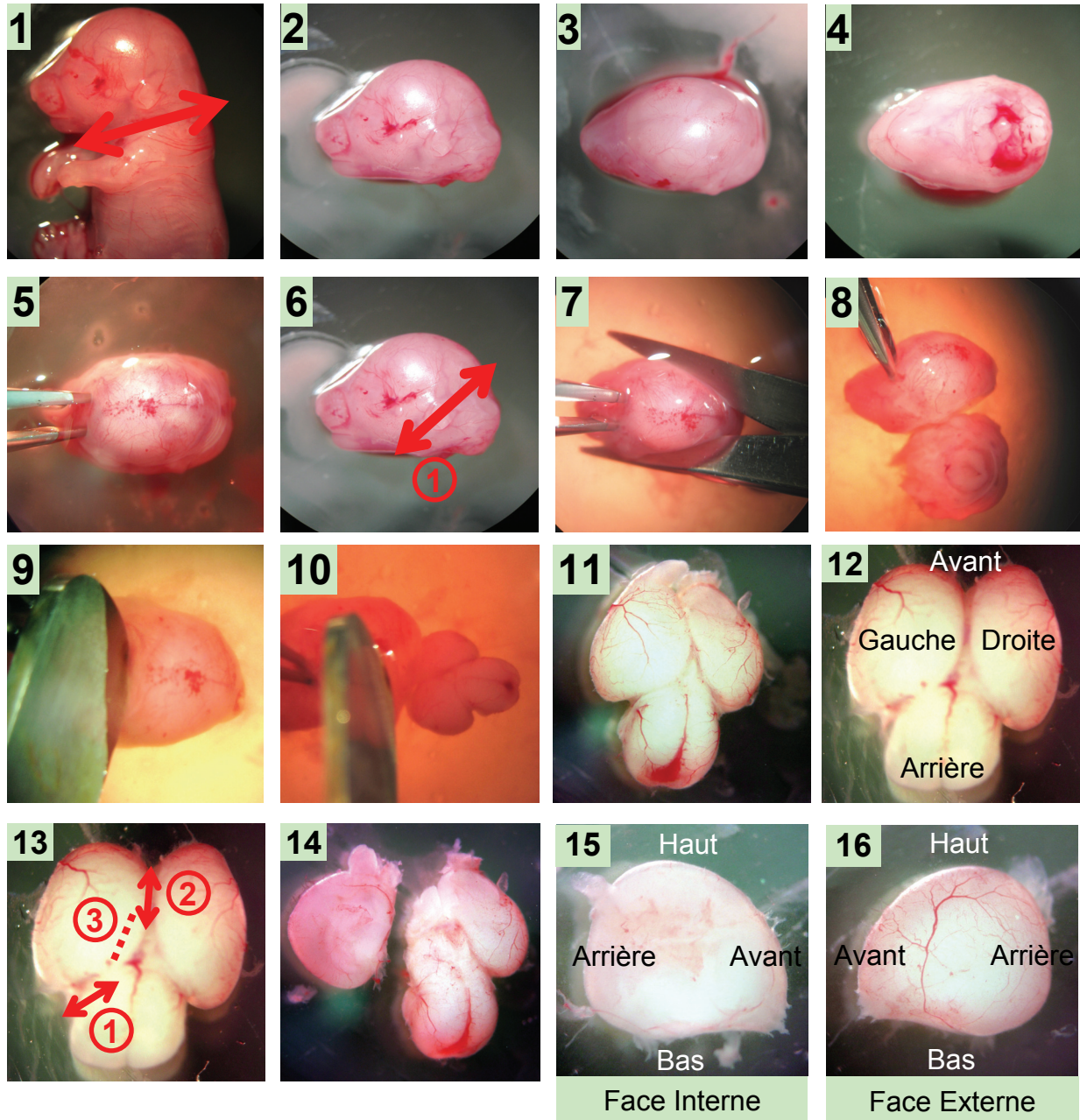


Figure 30 : Dissection d'hippocampes de cerveau de rat embryonnaire (partie 1)

Les premières étapes montrent la manière de prélever le cerveau de l'embryon de rat (photos 1 à 10). Une fois le cerveau extrait (photos 11 et 12), les hémisphères sont isolés (photos 13 à 16). Les flèches rouges montrent les axes de découpe.

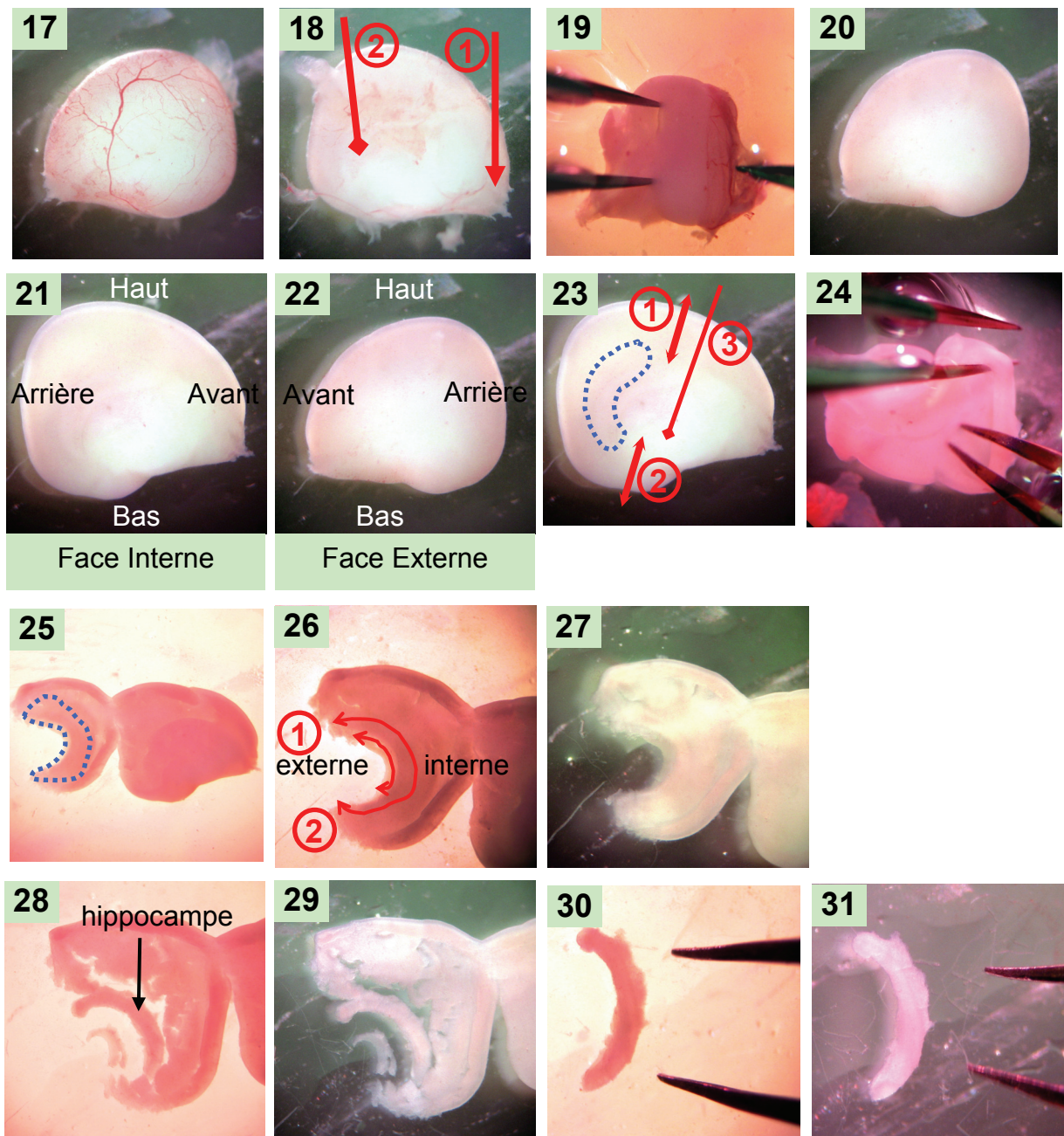


Figure 31 : Dissection d'hippocampes de cerveau de rat embryonnaire (partie 2)

Les méninges entourant chaque hémisphère sont retirés (photos 17 à 20). Les traits rouges montrent les points de maintien des tissus, et les flèches rouges indiquent les axes de découpe. Une fois les hémisphères correctement orientés, deux coupes permettent de déplier l'hippocampe (photos 23 et 24). L'hippocampe est alors découpé et isolé (photos 25 à 31).

Il est important de bien savoir s'orienter avec les hémisphères : voir les vues (**Figure 30, 15-16**). On observe que les hémisphères sont recouverts d'une pellicule vascularisée : ce sont les méninges (**Figure 31, 17**). Il faut retirer cette pellicule. Pour cela, placer l'hémisphère face interne vers le haut (**Figure 31, 18**) et attraper l'extrémité des méninges au niveau du bulbe olfactif **(1)** (celui-ci peut être présent ou non dépendant de la délicatesse de l'extraction du cerveau), tout en maintenant

l'hémisphère avec l'autre pince plantée (2). Saisir les méninges, les décoller (cela retourne l'hémisphère) et retirer les méninges sur toute la surface extérieure (**Figure 31, 19**), le dernier point d'attache est sur la face intérieure à la base de l'hippocampe, attention à ne pas arracher cette partie de l'hippocampe en détachant les méninges !

Vue d'un hémisphère gauche après avoir retiré les méninges : on aperçoit l'hippocampe sur la face interne : c'est un repli du cortex à l'arrière (**Figure 31, 23**, pointillés bleus). On place deux coupes de part et d'autre de l'hippocampe (1) et (2) tout en maintenant l'hémisphère (3) afin de pouvoir le « déplier » (**Figure 31, 25**). Il ne reste plus qu'à le découper soigneusement (**Figure 31, 26**), en enlevant la partie la plus externe (1) puis en découpant la partie interne (2). L'hippocampe ainsi dissocié (**Figure 31, 30-31**) est placé dans une Pétri 35 mm qui reçoit tous les hippocampes.

1.2.4 Dissociation et dépôt

Le reste de la manip sous hotte de culture cellulaire. Transférer les hippocampes avec une pipette 5 mL dans un tube 15 mL, compléter à 15 mL avec du HBSS sans Ca/Mg.

Centrifuger 30 s à 1000 rpm, aspirer le surnageant, ajouter 15 mL de HBSS sans Ca/Mg, centrifuger à nouveau 30s à 1000 rpm, aspirer le surnageant. Ces deux lavages servent à enlever le Ca/Mg et à diluer les contaminations éventuelles.

Ajouter 1,8 mL de milieu de dissociation, agiter et incuber 15 min à 37 °C dans l'incubateur.

Préparer deux pipettes Pasteur cotonnées stériles rodées à la flamme (de diamètres différents).

À la fin des 15 min, ajouter 180 µL de BSA 1 % pour inhiber la trypsine. Dissocier avec la pipette rodée de plus grand diamètre, 10 allers-retours et si ce n'est pas suffisant dissocier avec la pipette Pasteur rodée de plus petit diamètre (10 allers-retours). Mettre les cellules dissociées dans un tube 50 mL contenant 6 mL de milieu Neurobasal complet non conditionné (NB+). Si des filaments d'ADN sont visibles, ajouter une ou deux gouttes de DNase directement de l'aliquot ayant servi à préparer le milieu de trypsination.

Centrifuger 5 à 10 min à 1000 rpm. Aspirer le surnageant avec une pipette de 5 mL, pas avec le vide. Parfois il y a des filaments flottants sur lesquels sont accrochées les cellules, ne pas les aspirer ! Cela empêche souvent d'aspirer l'ensemble du surnageant (on peut laisser 1 mL...).

Homogénéiser, rajouter du Neurobasal complet non conditionné (NB+) pour obtenir 10 mL. Prélever deux fois 15 µL pour compter les cellules dans la cellule de Mallassez, un échantillon avec 15 µL de Tryptan Blue (optionnel, en général la viabilité est très bonne) et un échantillon sans.

Dans 10 carrés : N cellules dans 0.1 µL soit (N/10) millions de cellules dans les 10 mL, (N x 10,000) cellules par mL. Ajuster en diluant avec du NB+ pour aboutir à 120,000-200,000 cellules par mL. Déposer 500 µL de cellules (60,000 à 100,000 cellules) par lamelle (300 à 500 cellules/mm²).

Laisser les neurones adhérer pendant 4 h. Pendant ce temps, récupérer le NB+ conditionné sur les glies et le filtrer. Le placer dans des Pétri 100 mm (8-12 mL par boîte) dans l'incubateur. A la fin des 4 h, placer 8 lamelles de neurones par Pétri. Garder le NB+ conditionné non utilisé au frigo.

1.2.5 Culture et transfection

Si tout se passe bien, les neurones vont pousser et développer des dendrites et des axones. Après quelques jours (deux à trois), l'axone est en général bien reconnaissable sur la majorité des neurones (neurones dits de stade 3). Entre nos mains, les neurones sont transfectables avec le protocole ci-dessous à partir de trois jours en culture, et ce jusqu'à dix jours. Les neurones sont traités et fixés 24 à 48h après la transfection. S'ils ne sont pas transfectés, les neurones peuvent survivre sans problème jusqu'à trois semaines après la mise en culture.

Transfection de neurones en culture

Préparer, pour chaque transfection (2 lamelles), dans des tubes Eppendorf stériles :

- 1,6 ou 3 µg d'ADN dans 100 µL de Neurobasal sans B27. Mélanger. Laisser 15 min à température ambiante.
- 1,6 ou 3 µL de Lipofectamine 2000 dans 100 µL de Neurobasal sans B27. Mélanger. Laisser 5 min maximum à température ambiante.

Mélanger les deux solutions. Laisser 20 min à température ambiante.

Filtrer du milieu Neurobasal complet conditionné récupéré dans la boîte de culture des neurones. Transférer les lamelles dans des puits de 16 mm de diamètre contenant 500 µL de ce milieu filtré.

Ajouter 300 μ L du Neurobasal complet (non conditionné) dans chaque tube de mélange ADN-Lipofectamine-Plus.

Déposer 250 μ L de mélange sur les lamelles et incuber 3 h à 37 °C (mettre également le milieu filtré à 37 °C).

Remplacer le mélange par du milieu Neurobasal complet conditionné filtré et incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h.

2 Méthodes de quantification des images

Le travail réalisé utilise de manière intensive l'imagerie de fluorescence, grâce aux méthodes permettant d'obtenir une résolution subcellulaire : imagerie confocale, imagerie *widefield* à déconvolution. En aval de l'acquisition des images et de leur post-traitement (déconvolution), des méthodes de quantification et les algorithmes correspondants ont été développés pour mesurer la distribution subcellulaire du récepteur CB1 dans les cellules HEK-293 (Membrane Fluorescence Ratio MFR) et dans les neurones (Ratios Surface/Noyau S/N, Surface/Total S/T et Axone/Dendrite A/D).

2.1 Distribution de CB1-eGFP dans les cellules HEK-293

La méthode SCOP consiste à transfecter dans les cellules HEK-293 une protéine fusion comportant le récepteur d'intérêt, auquel est accroché l'eGFP au niveau carboxyterminal. Des images de cellules individuelles sont réalisées par microscopie confocale, permettant d'obtenir des coupes optiques équatoriales des cellules. Sur ces coupes, la membrane est clairement visible, ainsi que les compartiments intracellulaires : les cellules ont été déposées quelques heures avant la fixation, et possèdent donc une section assez circulaire au niveau du plan équatorial. On peut donc quantifier la distribution du récepteur en définissant la zone membranaire et la zone intracellulaire de la cellule et en mesurant les intensités de fluorescence eGFP dans ces deux zones. A l'origine, la mesure est effectuée le long de douze segments diamétraux : les douze profils d'intensité définissent la zone membranaire et la zone intracellulaire, permettant l'évaluation des intensités dans les deux compartiments (**Figure 32A**). Le résultat obtenu est le ratio Membrane/Intracellulaire M/I, qui dépend de la proportion de récepteurs membranaires.

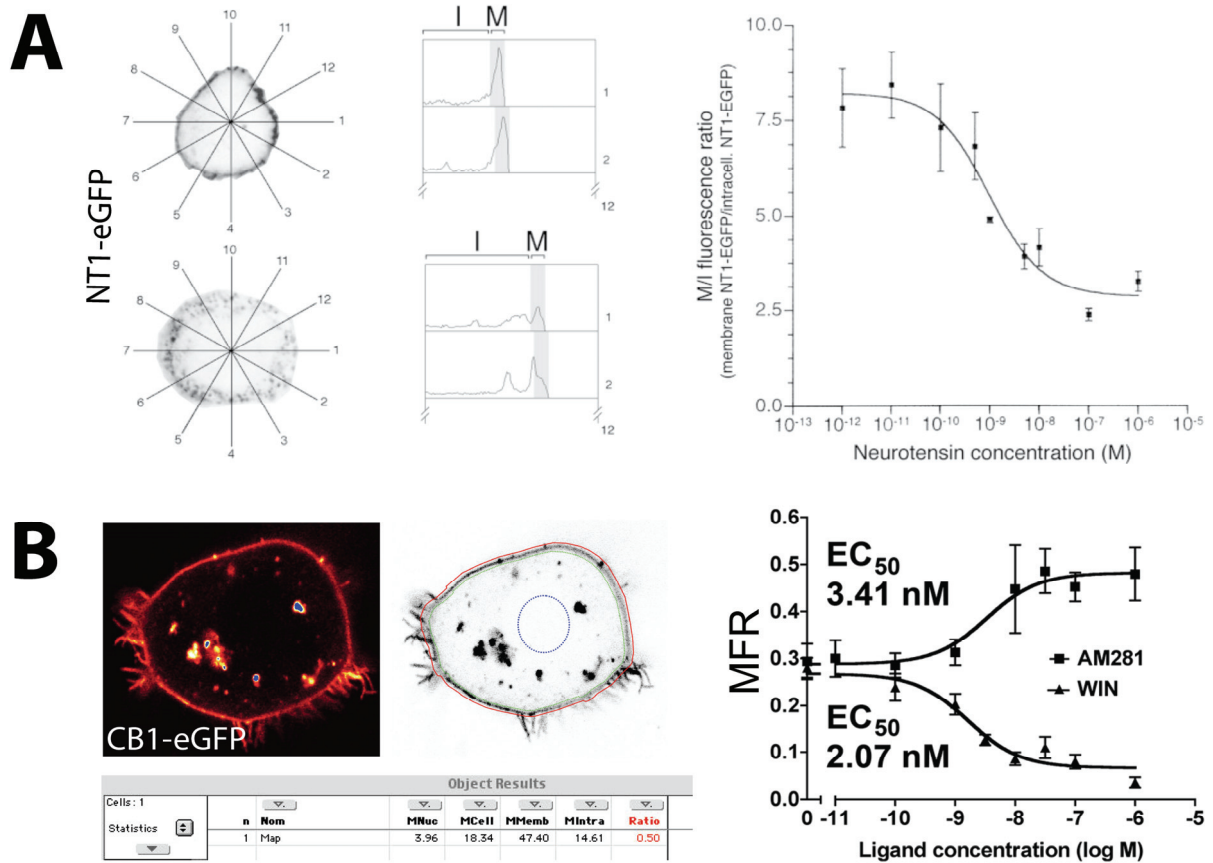


Figure 32 : Quantification du rapport de fluorescence membranaire (MFR) pour un RCPG

A/ Mode de quantification utilisé à l'origine par la méthode de *Single Cell Optical Pharmacology* (SCOP). A partir d'images confocales montrant la section équatoriale de cellules CHO exprimant le récepteur à la neurotensine fusionné avec l'eGFP (NT1-eGFP, à gauche), des profils d'intensité sont obtenus et permettent le calcul du rapport M/I (Membrane/Intracellulaire) pour chaque cellule imagée. Cette quantification permet de mesurer l'internalisation du récepteur NT1-eGFP sous l'effet de la neurotensine (à droite). D'après Lenkei et al., 2000.

B/ Implémentation de la méthode SCOP pour l'étude du trafic du récepteur CB1. Des cellules HEK-293 exprimant le récepteur CB1 en fusion avec l'eGFP sont imagées par microscopie confocale. Sur les images de sections équatoriales, la région nucléaire est estimée (pour le calcul du background, à droite en bleu), et l'extérieur de la membrane est défini manuellement (en rouge). La zone membranaire est définie comme la zone située à 8 pixels à l'intérieur de la membrane ainsi définie (en vert). La mesure des intensités de marquage dans la zone membranaire permet le calcul du rapport des populations membranaires et intracellulaire du récepteur CB1 (*Membrane Fluorescence Ratio* MFR). On peut dès lors mesurer l'internalisation du récepteur CB1 sous l'effet de l'agoniste WIN et l'externalisation sous l'effet de l'agoniste inverse AM281 (à droite).

Dans notre travail, nous avons utilisé une définition manuelle de la membrane cytoplasmique externe, servant de base à la mesure de l'intensité dans la zone membranaire (prise comme 8 pixels à l'intérieur de la membrane externe définie) et dans la zone cytoplasmique (zone incluse dans la zone membranaire) (**Figure 32B**). Dans tous les cas, les valeurs utilisées sont les intégrations des valeurs de chaque pixel, c'est-à-dire une intensité totale de la zone, qui prend en compte les tailles respectives des zones (à la différence d'une méthode basée sur les densités

moyennes dans les zones), ce qui permet de prendre en compte la variation de taille entre les différentes cellules. De plus, ces valeurs totales sont corrigées par la valeur de la fluorescence au niveau du noyau, pris comme *background*. La valeur obtenue est le ratio Membrane/Intracellulaire M/I, rebaptisé MFR, pour *Membrane Fluorescence Ratio*.

Il ne faut pas confondre ce ratio M/I ou MFR avec la proportion de récepteurs à la membrane, qui correspond au rapport entre la population membranaire des récepteurs et la population totale (ratio Surface/Total ou S/T). En effet, dans le cas d'une externalisation (augmentation de la population membranaire et diminution de la population cytoplasmique, population totale constante), le ratio S/T possède une limite de 1 (tous les récepteurs sont membranaires) tandis que le ratio M/I (ou MFR) n'a pas de limite supérieure (la valeur diverge quand la population intracellulaire s'annule), ce qui permet de faciliter la détection et la mesure du phénomène d'externalisation.

Le logiciel utilisé pour implémenter la quantification est une évolution du logiciel *open source* NIH image, appelée Object Image (<http://simon.bio.uva.nl/object-image.html>). Ce logiciel possède une structure orientée objet qui permet de définir des objets (« zone membranaire », « noyau ») de manière non destructive sur l'image, de les stocker et de réaliser des mesures. Ce logiciel, qui fonctionne sous Macintosh OS9, est cependant obsolète et une implémentation de l'algorithme utilisant le langage macro du logiciel *open source* ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) est en cours.

2.2 Quantification dans les neurones

2.2.1 Rapport Surface/Total : translocations somatodendritiques

Dans les cellules neuronales, la géométrie membranaire est beaucoup plus complexe que dans les cellules HEK-293, avec des prolongements de tailles différentes (branches et filopodes) et des invaginations parfois profondes de la membrane somatodendritique. L'approche SCOP par expression du récepteur CB1-eGFP s'est donc avérée inapplicable, ce qui a motivé l'ajout d'un épitope extracellulaire FLAG au niveau de la queue aminoterminal du récepteur. L'incubation rapide des neurones vivant avec l'anticorps anti-FLAG M1 juste avant la fixation et l'incubation avec l'anticorps secondaire rouge Alexa 568 permet d'obtenir un marquage des récepteurs CB1 présents à la surface des neurones. Ainsi, on peut imager simultanément la population totale des récepteurs CB1 (en vert grâce à l'eGFP) et la population en surface (en rouge grâce à l'anticorps M1 et l'Alexa 568). Un simple ratio des deux images (rouge et verte) fournit directement une valeur du ratio Surface/Total S/T pour le neurone imagé. En pratique, cette stratégie a été utilisée pour

évaluer la distribution des récepteurs CB1 au niveau du compartiment somatodendritique grâce à des images à fort grossissement des neurones transfectés (**Figure 33**).

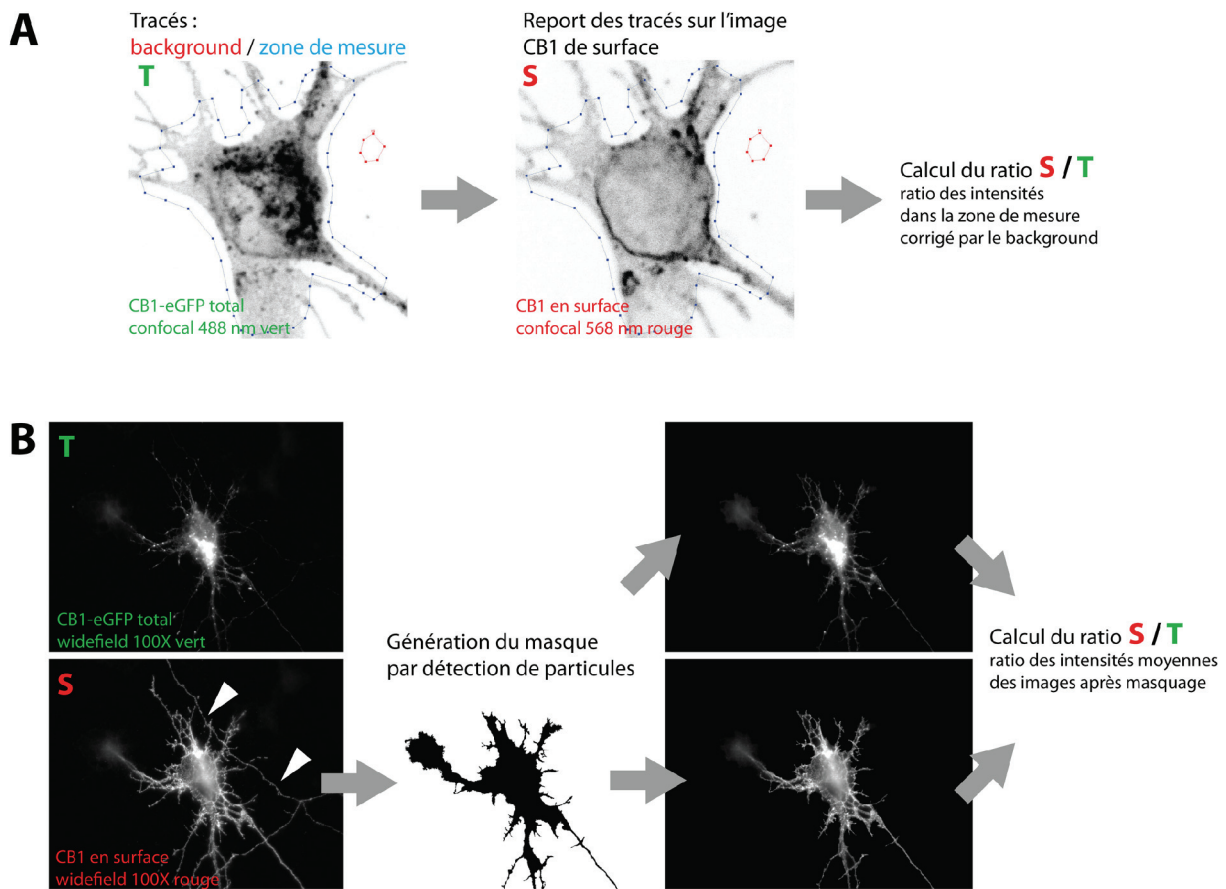


Figure 33 : Quantification du rapport Surface/Total pour les récepteurs FCB1-eGFP dans les neurones

Les neurones sont transfectés avec le récepteurs FCB1-eGFP comportant l'eGFP carboxyterminale et un épitope FLAG extracellulaire aminoterminal. Les récepteurs de surface sont détectés par incubation rapide des neurones vivants avec l'anticorps anti-FLAG M1 puis révélation avec un anticorps secondaire rouge (Alexa 568).

A/ Quantification à partir des images en microscopie confocale. Le compartiment somatodendritique des neurones transfectés est imagé à fort grossissement (objectif 63X, zoom 4). La zone de quantification est définie sur l'image eGFP (récepteur CB1-eGFP total), puis les intensités sont mesurées dans cette zone sur les images eGFP et CB1 de surface. Le ratio S/T (canal rouge/canal vert) est alors calculé.

B/ Quantification à partir des images en microscopie *widefield*. Le compartiment somatodendritique des neurones transfectés est imagé pour les canaux vert (eGFP) et rouge (marquage de surface) grâce à un objectif 100X. Un masque est défini à partir de l'image du récepteur de surface par recherche de particules sur l'image (*particle analysis* du logiciel ImageJ, au centre). Ce masque est appliqué sur les images des deux canaux et le rapport S/T est calculé à partir des images masquées (à droite). Le masque permet d'éliminer la contribution d'une partie des axones présents sur l'image d'origine (têtes de flèches en bas à gauche).

Au départ, la mesure s'effectuait grâce à une sélection manuelle de la zone somatodendritique suivie d'une mesure de l'intensité totale dans les canaux verts et rouge et du calcul du ratio S/T (**Figure 33A**). Avec l'utilisation du logiciel ImageJ, il est possible de détecter la zone somatodendritique de manière automatique à partir de l'image du récepteur de surface, en

ajustant les paramètres de la reconnaissance de particules (*particle analysis*). On peut alors créer un masque et l'appliquer pour la mesure des intensités sur les canaux vert et rouge, avant de calculer le ratio S/T (**Figure 33B**). Ce ratio permet d'évaluer, au niveau du compartiment somatodendritique, la proportion de récepteurs à la membrane. Bien entendu, la valeur obtenue n'est pas absolue puisque la mesure du marquage de surface (par un anticorps) et celle du marquage total (par l'eGFP) sont de natures différentes avec des fluorophores différents. Néanmoins, les variations de ce rapport entre les différentes conditions mesurent les translocations du récepteur qui ont lieu lors des traitements pharmacologiques.

2.2.2 Rapport S/N : utilisation de NeuronJ

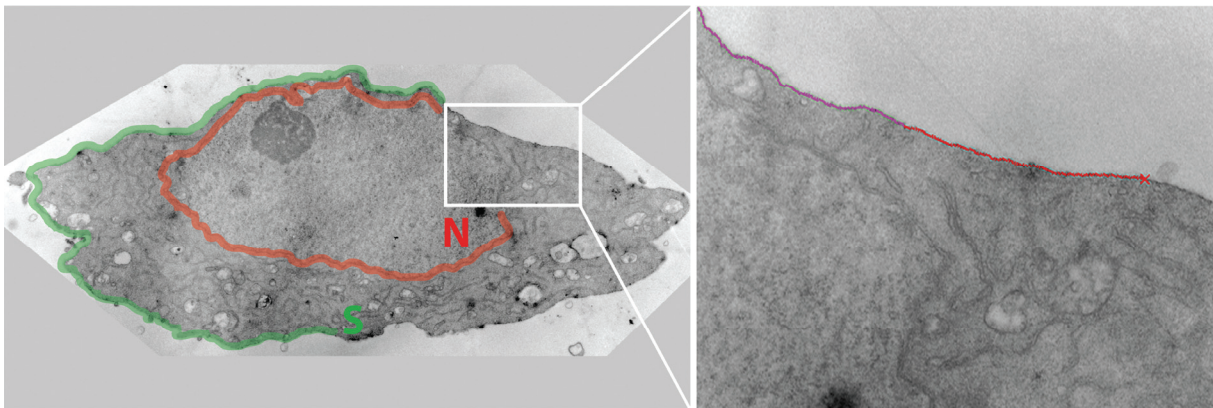


Figure 34 : Quantification du rapport Surface/Noyau pour les récepteurs CB1 endogènes

La microscopie électronique a été utilisée pour imaginer le récepteur CB1 endogène dans les neurones en culture, marqués avec une combinaison d'anticorps anti-CB1 C-Ter et N-Ter révélés par la DAB. La membrane plasmique (en vert) et la membrane nucléaire (en rouge) sont tracées à l'aide de l'algorithme de reconnaissance semi-automatique de contour NeuronJ. Cet algorithme permet de tracer le chemin entre des points placés par l'utilisateur (à droite, tracé rouge montrant la partie détectée automatiquement en partant du parcours déjà validé, en violet). L'expression somatodendritique membranaire du récepteur est mesurée par le rapport Surface/Noyau (S/N), où l'intensité du marquage membranaire est normalisée par l'intensité de le long de la membrane nucléaire, dépourvue de récepteurs CB1.

Pour évaluer la distribution des récepteurs CB1 endogènes dans les neurones en culture, nous avons utilisé des images de microscopie électronique à faible grossissement, permettant d'obtenir des profils complets du soma de neurones exprimant le récepteur CB1 (**Figure 34**). Le récepteur est marqué grâce à une double incubation avec les anticorps N-Ter et C-Ter, puis révélation par la diaminobenzidine (DAB). Pour évaluer l'intensité du marquage le long de la membrane plasmique, nous avons utilisé un *plugin* pour le logiciel ImageJ appelé NeuronJ. Cet algorithme, développé à l'origine pour le tracé des neurites sur des images de neurones en culture, permet le tracé automatique d'un contour entre des points défini par l'utilisateur (**Figure 34**, à

droite) (Meijering et al., 2004). Grâce à cet outil, il a été possible de tracer des contours le long de la membrane plasmique et le long de la membrane nucléaire. L'intensité de marquage du récepteur à la membrane a été mesurée par le rapport Surface/Noyau S/N, où le marquage de la membrane nucléaire (dépourvue de récepteurs) est utilisé comme normalisation. Cette mesure du ratio S/N a permis de quantifier les translocations des récepteurs CB1 endogènes induites par les agents pharmacologiques, agoniste WIN et agoniste inverse AM281.

2.2.3 Rapport A/D : polarisation de l'expression de CB1

Après avoir mesuré les variations de localisation du récepteur CB1 entre la membrane plasmique et les compartiments endosomaux, nous avons mesuré la polarisation du récepteur en termes de localisation axonale et somatodendritique. Pour cela, le *plugin* NeuronJ a été utilisé sur des images à faible grossissement des neurones en culture transfectés. Le travail de Sébastien Vaie au sein de l'équipe DRN a permis de modifier le plugin, qui mesurait initialement seulement les longueurs des contours tracés. Ceci a permis de mesurer les intensités de marquage le long des contours, et donc la densité moyenne de marquage. En traçant des contours le long des dendrites et de l'arborisation axonale pour un neurone transfecté, il est possible de calculer la densité moyenne d'expression axonale et somatodendritique de la protéine étudiée.

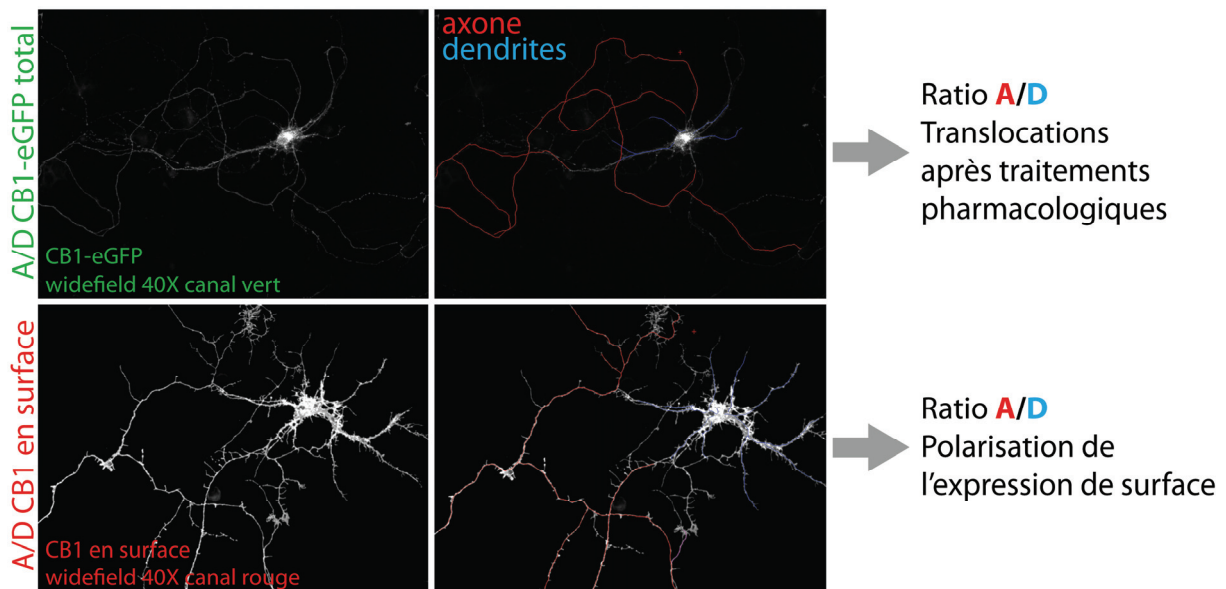


Figure 35 : Quantification du rapport Axone/Dendrite (A/D) et de la polarisation de l'expression de CB1

Pour mesurer la distribution du récepteur CB1 entre les compartiments somatodendritique et axonal, les neurones transfectés par FCB1-eGFP ou FCB1-eYFP (en vert) sont marqués pour le récepteur de surface (en rouge) et imagés à faible grossissement (objectif X20 ou X40). L'algorithme NeuronJ est utilisé pour mesurer la densité de marquage le long des dendrites (à droite, en bleu) et de l'arborisation axonale (en rouge). Le rapport Axone/Dendrite est calculé à partir de ces valeurs de densités moyennes.

A/ Mesure du ratio A/D des récepteurs totaux sur les images eGFP. Ceci permet de mesurer les translocations globales (surface + intracellulaire) entre les deux compartiments après les traitements pharmacologiques.

B/ Mesure du ratio A/D des récepteurs de surface. Ceci permet de quantifier la polarisation de l'expression de surface du récepteur CB1, et sa perturbation par la coexpression de mutants des protéines d'endocytose.

Un rapport Axone/Dendrite (A/D) peut dès lors être utilisé pour quantifier la distribution du récepteur CB1 entre ces deux compartiments (**Figure 35**). Ce rapport vaut 1 pour une protéine non polarisée, est supérieur à 1 pour une protéine axonale, inférieur à 1 pour une protéine somatodendritique. Cette méthode de mesure du rapport A/D a été utilisée précédemment par plusieurs autres équipes pour évaluer la distribution des protéines membranaires (Silverman et al., 2001). Nous avons utilisé cette méthode sur les images de la population totale des récepteurs CB1 (canal vert, eGFP), ce qui mesure les translocations des récepteurs entre les compartiments après les traitements pharmacologiques (**Figure 35A**). La mesure du rapport A/D a également été utilisée sur les images du récepteur CB1 de surface (canal rouge, anticorps M1), afin d'étudier l'effet de l'endocytose sur la distribution de surface du récepteur CB1 (**Figure 35B**).

RÉFÉRENCES

- Abadji V, Lucas-Lenard JM, Chin C, Kendall DA (1999) Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem* 72:2032-2038.
- Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, Makriyannis A (1994) (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem* 37:1889-1893.
- Abramow-Newerly M, Roy AA, Nunn C, Chidiac P (2005) RGS proteins have a signalling complex: Interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal*.
- Adan RA, Kas MJ (2003) Inverse agonism gains weight. *Trends Pharmacol Sci* 24:315-321.
- Ahmari SE, Buchanan J, Smith SJ (2000) Assembly of presynaptic active zones from cytoplasmic transport packets. *Nat Neurosci* 3:445-451.
- Albert PR, Tiberi M (2001) Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12:453-460.
- Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH (1999) Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT1A receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem* 274:35469-35474.
- Alewijnse AE, Timmerman H, Jacobs EH, Smit MJ, Roovers E, Cotecchia S, Leurs R (2000) The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor. *Mol Pharmacol* 57:890-898.
- Alger BE (2005) Endocannabinoid identification in the brain: studies of breakdown lead to breakthrough, and there may be NO hope. *Sci STKE* 2005:pe51.
- Alger BE, Pitler TA, Wagner JJ, Martin LA, Morishita W, Kirov SA, Lenz RA (1996) Retrograde signalling in depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 cells. *J Physiol* 496 (Pt 1):197-209.
- Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, 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 U S A* 88:11354-11358.
- Ango F, Pin JP, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Bockaert J, Fagni L (2000) Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *J Neurosci* 20:8710-8716.
- Arimura N, Kaibuchi K (2005) Key regulators in neuronal polarity. *Neuron* 48:881-884.

- Augenbraun E, Maxfield FR, St Jules R, Setlik W, Holtzman E (1993) Properties of acidified compartments in hippocampal neurons. *Eur J Cell Biol* 61:34-43.
- Baas PW, Black MM, Banker GA (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109:3085-3094.
- Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8335-8339.
- Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.
- Banker GA, Cowan WM (1979) Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol* 187:469-493.
- Barak LS, Oakley RH, Laporte SA, Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:93-98.
- Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Martenson C, Meyer T, Caron MG (1997) Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol* 51:177-184.
- Baratti-Elbaz C, Ghinea N, Lahuna O, Loosfelt H, Pichon C, Milgrom E (1999) Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor. *Mol Endocrinol* 13:1751-1765.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Bartlett WP, Banker GA (1984a) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4:1954-1965.
- Bartlett WP, Banker GA (1984b) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4:1944-1953.
- Bass CE, Griffin G, Grier M, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR (2002) SR-141716A-induced stimulation of locomotor activity. A structure-activity relationship study. *Pharmacol Biochem Behav* 74:31-40.
- Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005) Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106:133-145.
- Behnia R, Munro S (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438:597-604.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 353:23-31.

- Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G (1994) Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* 23:279-295.
- Berg KA, Stout BD, Maayani S, Clarke WP (2001) Differences in rapid desensitization of 5-hydroxytryptamine_{2A} and 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor-mediated phospholipase C activation. *J Pharmacol Exp Ther* 299:593-602.
- Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP (2005) Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26:625-630.
- Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M (2004) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol* 18:2074-2084.
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031:163-224.
- Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, Ishido M, Barberis C, Antaramian A, Brabet P, Rosenthal W (1992) Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357:333-335.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163:463-468.
- Bodor AL, Katona I, Nyiri G, Mackie K, Ledent C, Hajos N, Freund TF (2005) Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci* 25:6845-6856.
- Bond RA, Leff P, Johnson TD, Milano CA, Rockman HA, McMinn TR, Apparsundaram S, Hyek MF, Kenakin TP, Allen LF, et al. (1995) Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. *Nature* 374:272-276.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR (1998) Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287:884-888.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-166.
- Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R (1994) The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience* 58:167-182.
- Bouaboula M, Dussosoy D, Casellas P (1999a) Regulation of peripheral cannabinoid receptor CB₂ phosphorylation by the inverse agonist SR 144528. Implications for receptor biological responses. *J Biol Chem* 274:20397-20405.
- Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P (1999b) Cannabinoid receptor CB₁ activates the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *FEBS Lett* 449:61-65.

- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995a) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 270:13973-13980.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995b) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2):637-641.
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem* 272:22330-22339.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-373.
- Brady AE, Limbird LE (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal* 14:297-309.
- Breivogel CS, Walker JM, Huang SM, Roy MB, Childers SR (2004) Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. *Neuropharmacology* 47:81-91.
- Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275:17596-17604.
- Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70:715-728.
- Burack MA, Silverman MA, Banker G (2000) The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* 26:465-472.
- Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzone MR, Hamm HE (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* 24:765-781.
- Cameron PL, Sudhof TC, Jahn R, De Camilli P (1991) Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J Cell Biol* 115:151-164.
- Campenot RB (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4516-4519.
- Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, von Zastrow M (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401:286-290.
- Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 5:723-724.

- Carroll RC, Beattie EC, Xia H, Luscher C, Altschuler Y, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1999) Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14112-14117.
- Castro M, Nikolaev VO, Palm D, Lohse MJ, Vilaradaga JP (2005) Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16084-16089.
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G (1995) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5:385-388.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Chalmers DT, Behan DP (2002) The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics. *Nat Rev Drug Discov* 1:599-608.
- Chaumont S, Jiang LH, Penna A, North RA, Rassendren F (2004) Identification of a trafficking motif involved in the stabilization and polarization of P2X receptors. *J Biol Chem* 279:29628-29638.
- Chavrier P, Gorvel JP, Stelzer E, Simons K, Gruenberg J, Zerial M (1991) Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353:769-772.
- Childers SR, Deadwyler SA (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 52:819-827.
- Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323-374.
- Civelli O, Saito Y, Wang Z, Nothacker HP, Reinscheid RK (2005) Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol Ther*.
- Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK (2001) Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 24:230-237.
- Colman DR (1999) Neuronal polarity and the epithelial metaphor. *Neuron* 23:649-651.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.
- Cosi C, Koek W (2001) Agonist, antagonist, and inverse agonist properties of antipsychotics at human recombinant 5-HT(1A) receptors expressed in HeLa cells. *Eur J Pharmacol* 433:55-62.
- Costa T, Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7321-7325.
- Costa T, Cotecchia S (2005) Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26:618-624.

- Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross RA, MacEwan DJ, Mackie K, Pertwee RG, Irving AJ (2001) Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21:2425-2433.
- Craig AM, Banker G (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Craig AM, Blackstone CD, Hagan RL, Banker G (1994) Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12373-12377.
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004) The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61:149-160.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87.
- D'Ambra TE, Estep KG, Bell MR, Eissenstat MA, Josef KA, Ward SJ, Haycock DA, Baizman ER, Casiano FM, Beglin NC, et al. (1992) Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 35:124-135.
- Da Silva JS, Hasegawa T, Miyagi T, Dotti CG, Abad-Rodriguez J (2005) Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci* 8:606-615.
- Dabrowski M, Aerts S, Van Hummelen P, Craessaerts K, De Moor B, Annaert W, Moreau Y, De Strooper B (2003) Gene profiling of hippocampal neuronal culture. *J Neurochem* 85:1279-1288.
- Dale LB, Seachrist JL, Babwah AV, Ferguson SS (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *J Biol Chem* 279:13110-13118.
- Dale LB, Bhattacharya M, Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS (2001) Agonist-stimulated and tonic internalization of metabotropic glutamate receptor 1a in human embryonic kidney 293 cells: agonist-stimulated endocytosis is beta-arrestin1 isoform-specific. *Mol Pharmacol* 60:1243-1253.
- Daly CJ, McGrath JC (2003) Fluorescent ligands, antibodies, and proteins for the study of receptors. *Pharmacol Ther* 100:101-118.
- Damke H, Baba T, van der Blik AM, Schmid SL (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol* 131:69-80.
- Daniel H, Rancillac A, Crepel F (2004) Mechanisms underlying cannabinoid inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx at parallel fibre synapses of the rat cerebellum. *J Physiol* 557:159-174.
- Darmon M, Langlois X, Suffisseau L, Fattaccini CM, Hamon M (1998) Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem* 71:2294-2303.

- de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436:704-708.
- De Camilli P, Takei K, McPherson PS (1995) The function of dynamin in endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 5:559-565.
- De Deurwaerdere P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U (2004) Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci* 24:3235-3241.
- de Ligt RA, Kourounakis AP, AP IJ (2000) Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol* 130:1-12.
- De Matteis MA, Godi A (2004) PI-loting membrane traffic. *Nat Cell Biol* 6:487-492.
- De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V (1998) The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8375-8380.
- DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW (2000) The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11086-11091.
- Derkinderen P, Toutant M, Kadare G, Ledent C, Parmentier M, Girault JA (2001) Dual role of Fyn in the regulation of FAK^{6,7} by cannabinoids in hippocampus. *J Biol Chem* 276:38289-38296.
- Derkinderen P, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano JC, de Franciscis V, Gelman M, Girault JA (1996) Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* 273:1719-1722.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23:2371-2382.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 75:2434-2444.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10819-10824.

- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-79.
- Dotti CG, Simons K (1990) Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* 62:63-72.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Dugani CB, Klip A (2005) Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep* 6:1137-1142.
- Egertova M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422:159-171.
- Fache MP, Moussif A, Fernandes F, Giraud P, Garrido JJ, Dargent B (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J Cell Biol* 166:571-578.
- Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Richmond A (2003) Differential regulation of CXCR2 trafficking by Rab GTPases. *Blood* 101:2115-2124.
- Farhan H, Korkhov VM, Paulitschke V, Dorostkar MM, Scholze P, Kudlacek O, Freissmuth M, Sitte HH (2004) Two discontinuous segments in the carboxyl terminus are required for membrane targeting of the rat gamma-aminobutyric acid transporter-1 (GAT1). *J Biol Chem* 279:28553-28563.
- Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131:1435-1452.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 57:279-288.
- Fourgeaud L, Bessis AS, Rossignol F, Pin JP, Olivo-Marin JC, Hemar A (2003) The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway. *J Biol Chem* 278:12222-12230.
- Fraile-Ramos A, Kledal TN, Pelchen-Matthews A, Bowers K, Schwartz TW, Marsh M (2001) The human cytomegalovirus US28 protein is located in endocytic vesicles and undergoes constitutive endocytosis and recycling. *Mol Biol Cell* 12:1737-1749.
- Francesconi A, Duvoisin RM (2002) Alternative splicing unmasks dendritic and axonal targeting signals in metabotropic glutamate receptor 1. *J Neurosci* 22:2196-2205.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.

- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Fukata Y, Kimura T, Kaibuchi K (2002) Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 43:305-315.
- Gaborik Z, Hunyady L (2004) Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:286-293.
- Gagnon AW, Kallal L, Benovic JL (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273:6976-6981.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107-144.
- Garrido JJ, Fernandes F, Giraud P, Mouret I, Pasqualini E, Fache MP, Jullien F, Dargent B (2001) Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *Embo J* 20:5950-5961.
- Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1996) 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 307:331-338.
- Gatley SJ, Lan R, Pyatt B, Gifford AN, Volkow ND, Makriyannis A (1997) Binding of the non-classical cannabinoid CP 55,940, and the diarylpyrazole AM251 to rodent brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 61:PL 191-197.
- Gatley SJ, Lan R, Volkow ND, Pappas N, King P, Wong CT, Gifford AN, Pyatt B, Dewey SL, Makriyannis A (1998) Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *J Neurochem* 70:417-423.
- George SR, O'Dowd BF, Lee SP (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1:808-820.
- Gerard C, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 18:7142.
- Gether U, Ballesteros JA, Seifert R, Sanders-Bush E, Weinstein H, Kobilka BK (1997) Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *J Biol Chem* 272:2587-2590.
- Ghavami A, Stark KL, Jareb M, Ramboz S, Segu L, Hen R (1999) Differential addressing of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in epithelial cells and neurons. *J Cell Sci* 112 (Pt 6):967-976.
- Gifford AN, Bruneus M, Gatley SJ, Volkow ND (2000) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from hippocampal and cortical synaptosomes. *Br J Pharmacol* 131:645-650.
- Gifford AN, Bruneus M, Gatley SJ, Lan R, Makriyannis A, Volkow ND (1999) Large receptor reserve for cannabinoid actions in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 288:478-483.

- Ginty DD, Segal RA (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268-274.
- Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005) Anandamide transport: a critical review. *Life Sci* 77:1584-1604.
- Glass M, Felder CC (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17:5327-5333.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 77:299-318.
- Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M (2000) The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 347:369-373.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:721-730.
- Grundy RI, Rabuffetti M, Beltramo M (2001) Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 24:29-51.
- Guan XM, Kobilka TS, Kobilka BK (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. *J Biol Chem* 267:21995-21998.
- Guo DF, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T (2003) Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 310:1254-1265.
- Guzman M, Sanchez C (1999) Effects of cannabinoids on energy metabolism. *Life Sci* 65:657-664.
- Guzman M, Galve-Roperh I, Sanchez C (2001) Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 22:19-22.
- Hajos N, Freund TF (2002) Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chem Phys Lipids* 121:73-82.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci* 12:3239-3249.
- Hall RA, Lefkowitz RJ (2002) Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res* 91:672-680.

- Hampson RE, Zhuang SY, Weiner JL, Deadwyler SA (2003) Functional significance of cannabinoid-mediated, depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in the hippocampus. *J Neurophysiol* 90:55-64.
- Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R (1993) Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 36:3032-3034.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3662-3665.
- Hao M, Lin SX, Karylowski OJ, Wustner D, McGraw TE, Maxfield FR (2002) Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem* 277:609-617.
- Hargrave PA, McDowell JH (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *Faseb J* 6:2323-2331.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264:12657-12665.
- Hay DL, Poyner DR, Sexton PM (2006) GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol Ther* 109:173-197.
- Hemar A, Olivo JC, Williamson E, Saffrich R, Dotti CG (1997) Dendroaxonal transcytosis of transferrin in cultured hippocampal and sympathetic neurons. *J Neurosci* 17:9026-9034.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-1936.
- Heuser JE, Anderson RG (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108:389-400.
- Hillard CJ, Muthian S, Kearn CS (1999) Effects of CB(1) cannabinoid receptor activation on cerebellar granule cell nitric oxide synthase activity. *FEBS Lett* 459:277-281.
- Hirokawa N, Takemura R (2004) Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases. *Curr Opin Neurobiol* 14:564-573.
- Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B, Vilardaga JP, Tsien RY, Ellisman MH, Lohse MJ (2005) A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2:171-176.
- Hohmann AG (2002) Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids* 121:173-190.

- Hommelgaard AM, Roepstorff K, Vilhardt F, Torgersen ML, Sandvig K, van Deurs B (2005) Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic* 6:720-724.
- Horton AC, Ehlers MD (2003) Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40:277-295.
- Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* 22:132-140.
- Howlett AC (2004) Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* 142:1209-1218.
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532-538.
- Howlett AC, Mukhopadhyay S (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids* 108:53-70.
- Howlett AC, Song C, Berglund BA, Wilken GH, Pigg JJ (1998) Characterization of CB1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragments and site-directed antibodies. *Mol Pharmacol* 53:504-510.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:345-358.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161-202.
- Hsieh C, Brown S, Derleth C, Mackie K (1999) Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Neurochem* 73:493-501.
- Hur EM, Kim KT (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14:397-405.
- Hurst DP, Lynch DL, Barnett-Norris J, Hyatt SM, Seltzman HH, Zhong M, Song ZH, Nie J, Lewis D, Reggio PH (2002) N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol* 62:1274-1287.
- Ikonen E, Parton RG, Hunziker W, Simons K, Dotti CG (1993) Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor in cultured hippocampal neurons. *Curr Biol* 3:635-644.
- Innamorati G, Le Gouill C, Balamotis M, Birnbaumer M (2001) The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 276:13096-13103.
- Irving AJ, Coutts AA, Harvey J, Rae MG, Mackie K, Bewick GS, Pertwee RG (2000) Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 98:253-262.

- Jareb M, Banker G (1998) The polarized sorting of membrane proteins expressed in cultured hippocampal neurons using viral vectors. *Neuron* 20:855-867.
- Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Peleraux A, Penarier G, Soubrie P, Le Fur G, Galiegue S, Casellas P (2005) The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *Faseb J* 19:1567-1569.
- Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Cerver JP, Kover A, Chavkin C, Mackie K (1999) Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 19:3773-3780.
- Jolimay N, Franck L, Langlois X, Hamon M, Darmon M (2000) Dominant role of the cytosolic C-terminal domain of the rat 5-HT1B receptor in axonal-apical targeting. *J Neurosci* 20:9111-9118.
- Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* 94:253-262.
- Jung M, Calassi R, Rinaldi-Carmona M, Chardenot P, Le Fur G, Soubrie P, Oury-Donat F (1997) Characterization of CB1 receptors on rat neuronal cell cultures: binding and functional studies using the selective receptor antagonist SR 141716A. *J Neurochem* 68:402-409.
- Kaether C, Skehel P, Dotti CG (2000) Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 11:1213-1224.
- Kahlig KM, Javitch JA, Galli A (2004) Amphetamine regulation of dopamine transport. Combined measurements of transporter currents and transporter imaging support the endocytosis of an active carrier. *J Biol Chem* 279:8966-8975.
- Kallal L, Benovic JL (2000) Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 21:175-180.
- Kanaani J, el-Husseini Ael D, Aguilera-Moreno A, Diacovo JM, Bredt DS, Baekkeskov S (2002) A combination of three distinct trafficking signals mediates axonal targeting and presynaptic clustering of GAD65. *J Cell Biol* 158:1229-1238.
- Karten B, Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE (2005) Neuronal models for studying lipid metabolism and transport. *Methods* 36:117-128.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558.
- Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797-804.
- Katsura T, Verbavatz JM, Farinas J, Ma T, Ausiello DA, Verkman AS, Brown D (1995) Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water

- channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7212-7216.
- Keller P, Toomre D, Diaz E, White J, Simons K (2001) Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3:140-149.
- Kenakin T (2004a) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 25:186-192.
- Kenakin T (2004b) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol Pharmacol* 65:2-11.
- Kenakin T (2005) The physiological significance of constitutive receptor activity. *Trends in Pharmacological Sciences* 26:603-605.
- Keren O, Sarne Y (2003) Multiple mechanisms of CB1 cannabinoid receptors regulation. *Brain Res* 980:197-205.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2005) Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol*.
- Kittler JT, Moss SJ (2001) Neurotransmitter receptor trafficking and the regulation of synaptic strength. *Traffic* 2:437-448.
- Kobayashi T, Storrie B, Simons K, Dotti CG (1992) A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. *Nature* 359:647-650.
- Koenig JA, Edwardson JM (1997) Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18:276-287.
- Krasel C, Vilardaga JP, Bunemann M, Lohse MJ (2004) Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization. *Biochem Soc Trans* 32:1029-1031.
- Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol* 162:113-124.
- Kreienkamp HJ (2002) Organisation of G-protein-coupled receptor signalling complexes by scaffolding proteins. *Curr Opin Pharmacol* 2:581-586.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717-727.
- Kreuzer OJ, Krisch B, Dery O, Bunnett NW, Meyerhof W (2001) Agonist-mediated endocytosis of rat somatostatin receptor subtype 3 involves beta-arrestin and clathrin coated vesicles. *J Neuroendocrinol* 13:279-287.
- Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103:21-80.
- Landsman RS, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI (1997) SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* 334:R1-2.

- Langlois X, el Mestikawy S, Arpin M, Triller A, Hamon M, Darmon M (1996) Differential addressing of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in transfected LLC-PK1 epithelial cells: a model of receptor targeting in neurons. *Neuroscience* 74:297-302.
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS (1999) The beta₂-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3712-3717.
- Lauckner JE, Hille B, Mackie K (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19144-19149.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB₁ receptor knockout mice. *Science* 283:401-404.
- Lee TW, Cotecchia S, Milligan G (1997) Up-regulation of the levels of expression and function of a constitutively active mutant of the hamster alpha_{1B}-adrenoceptor by ligands that act as inverse agonists. *Biochem J* 325 (Pt 3):733-739.
- Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 16:89-97.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25:413-422.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512-517.
- Lenkei Z, Beaudet A, Chartrel N, De Mota N, Irinopoulou T, Braun B, Vaudry H, Llorens-Cortes C (2000) A highly sensitive quantitative cytosensor technique for the identification of receptor ligands in tissue extracts. *J Histochem Cytochem* 48:1553-1564.
- Li J, Chen C, Huang P, Liu-Chen LY (2001) Inverse agonist up-regulates the constitutively active D3.49(164)Q mutant of the rat mu-opioid receptor by stabilizing the structure and blocking constitutive internalization and down-regulation. *Mol Pharmacol* 60:1064-1075.
- Li JG, Benovic JL, Liu-Chen LY (2000) Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Mol Pharmacol* 58:795-801.
- Limbird LE (2004) The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv* 4:326-336.
- Linden DJ (2001) The expression of cerebellar LTD in culture is not associated with changes in AMPA-receptor kinetics, agonist affinity, or unitary conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14066-14071.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56:801-813.

- Little PJ, Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR (1988) Pharmacology and stereoselectivity of structurally novel cannabinoids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 247:1046-1051.
- Llano I, Leresche N, Marty A (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6:565-574.
- Lohse MJ, Vilardaga JP, Bunemann M (2003) Direct optical recording of intrinsic efficacy at a G protein-coupled receptor. *Life Sci* 74:397-404.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248:1547-1550.
- Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J* 12:677-682.
- Luscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 3:545-550.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.
- Lutz B (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:123-142.
- MacEwan DJ, Milligan G (1996) Up-regulation of a constitutively active form of the beta2-adrenoceptor by sustained treatment with inverse agonists but not antagonists. *FEBS Lett* 399:108-112.
- Mackie K (2005) Cannabinoid Receptors as Therapeutic Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3825-3829.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15:6552-6561.
- MacLennan SJ, Reynen PH, Kwan J, Bonhaus DW (1998) Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Br J Pharmacol* 124:619-622.
- Maehle AH, Prull CR, Halliwell RF (2002) The emergence of the drug receptor theory. *Nat Rev Drug Discov* 1:637-641.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31:463-475.
- Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of cannabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. *Neurosci Lett* 143:200-204.

- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Marchese A, Benovic JL (2001) Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276:45509-45512.
- Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368-376.
- Marion S, Weiner DM, Caron MG (2004) RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *J Biol Chem* 279:2945-2954.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84-88.
- Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouille P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D, Galli T (2001) A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci* 21:3830-3838.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535-550.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- Matyas F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF (2006) Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 137:337-361.
- Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:121-132.
- Mayor S, Sabharanjak S, Maxfield FR (1998) Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *Embo J* 17:4626-4638.
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME (1999) Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 291:618-626.
- McCarthy JB, Lim ST, Elkind NB, Trimmer JS, Duvoisin RM, Rodriguez-Boulan E, Caplan MJ (2001) The C-terminal tail of the metabotropic glutamate receptor subtype 7 is necessary but not sufficient for cell surface delivery and polarized targeting in neurons and epithelia. *J Biol Chem* 276:9133-9140.
- McCune DF, Edelmann SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, Perez DM, Piascik MT (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol Pharmacol* 57:659-666.
- McIntosh HH, Song C, Howlett AC (1998) CB1 cannabinoid receptor: cellular regulation and distribution in N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 53:163-173.

- McLean AJ, Bevan N, Rees S, Milligan G (1999) Visualizing differences in ligand regulation of wild-type and constitutively active mutant beta(2)-adrenoceptor-green fluorescent protein fusion proteins. *Mol Pharmacol* 56:1182-1191.
- McLean AJ, Zeng FY, Behan D, Chalmers D, Milligan G (2002) Generation and analysis of constitutively active and physically destabilized mutants of the human beta(1)-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 62:747-755.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1967) The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 12:1109-1111.
- Mechoulam R, Hanus L (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* 108:1-13.
- Mechoulam R, Braun P, Gaoni Y (1967) A stereospecific synthesis of (-)-delta 1- and (-)-delta 1(6)-tetrahydrocannabinols. *J Am Chem Soc* 89:4552-4554.
- Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Jarbe TU, Hiltunen AJ, Consroe P (1988) Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia* 44:762-764.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90.
- Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58:167-176.
- Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzman M, Di Marzo V (1999) Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 463:235-240.
- Melikian HE (2004) Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacol Ther* 104:17-27.
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575-625.
- Meng EC, Bourne HR (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci* 22:587-593.
- Milligan G (1999) Exploring the dynamics of regulation of G protein-coupled receptors using green fluorescent protein. *Br J Pharmacol* 128:501-510.
- Milligan G (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64:1271-1276.
- Milligan G, Bond RA (1997) Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends Pharmacol Sci* 18:468-474.
- Milligan G, Stevens PA, Ramsay D, McLean AJ (2002) Ligand rescue of constitutively active mutant receptors. *Neurosignals* 11:29-33.

- Miquel MC, Emerit MB, Gozlan H, Hamon M (1991) Involvement of tryptophan residue(s) in the specific binding of agonists/antagonists to 5-HT₃ receptors in NG108-15 clonal cells. *Biochem Pharmacol* 42:1453-1461.
- Miserey-Lenkei S, Lenkei Z, Parnot C, Corvol P, Clauser E (2001) A functional enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged angiotensin II at(1a) receptor recruits the endogenous Galphaq/11 protein to the membrane and induces its specific internalization independently of receptor-g protein coupling in HEK-293 cells. *Mol Endocrinol* 15:294-307.
- Miserey-Lenkei S, Parnot C, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002) Constitutive internalization of constitutively active agiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J Biol Chem* 277:5891-5901.
- Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21:1735-1742.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J Mol Biol* 12:88-118.
- Moore RH, Tuffaha A, Millman EE, Dai W, Hall HS, Dickey BF, Knoll BJ (1999) Agonist-induced sorting of human beta2-adrenergic receptors to lysosomes during downregulation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):329-338.
- Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, Xu YC, Phebus L, Simmons RM, Li D, Iyengar S, Felder CC (2005) Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17852-17857.
- Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105:887-895.
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, Schunack W, Ganellin CR, Schwartz JC, Arrang JM (2000) High constitutive activity of native H₃ receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408:860-864.
- Morozov YM, Freund TF (2003) Post-natal development of type 1 cannabinoid receptor immunoreactivity in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 18:1213-1222.
- Morris DP, Price RR, Smith MP, Lei B, Schwinn DA (2004) Cellular trafficking of human alpha1a-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol Pharmacol* 66:843-854.
- Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:91-118.
- Morrison KJ, Moore RH, Carsrud ND, Trial J, Millman EE, Tuvim M, Clark RB, Barber R, Dickey BF, Knoll BJ (1996) Repetitive endocytosis and recycling of the beta 2-adrenergic receptor during agonist-induced steady state redistribution. *Mol Pharmacol* 50:692-699.

- Mostov K, Su T, ter Beest M (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 5:287-293.
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759-803.
- Mukhopadhyay S, Howlett AC (2001) CB1 receptor-G protein association. Subtype selectivity is determined by distinct intracellular domains. *Eur J Biochem* 268:499-505.
- Mundigl O, Matteoli M, Daniell L, Thomas-Reetz A, Metcalf A, Jahn R, De Camilli P (1993) Synaptic vesicle proteins and early endosomes in cultured hippocampal neurons: differential effects of Brefeldin A in axon and dendrites. *J Cell Biol* 122:1207-1221.
- Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol* 158:563-575.
- Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T, Kusumi A (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5:626-632.
- Nakata T, Hirokawa N (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162:1045-1055.
- Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1996) Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* 271:21604-21613.
- Newman-Tancredi A, Audinot V, Moreira C, Verrièle L, Millan MJ (2000) Inverse agonism and constitutive activity as functional correlates of serotonin h5-HT(1B) receptor/G-protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* 58:1042-1049.
- Nie J, Lewis DL (2001a) The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience* 107:161-167.
- Nie J, Lewis DL (2001b) Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J Neurosci* 21:8758-8764.
- Niswender CM, Copeland SC, Herrick-Davis K, Emeson RB, Sanders-Bush E (1999) RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem* 274:9472-9478.
- Nizak C, Monier S, del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F (2003) Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 300:984-987.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I (1998) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395:172-177.

- Nyiri G, Cserep C, Szabadits E, Mackie K, Freund TF (2005) CB(1) cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience* 136:811-822.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274:32248-32257.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275:17201-17210.
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ (2001) Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods* 112:95-99.
- Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* 29:729-738.
- Okamoto CT, Forte JG (2001) Vesicular trafficking machinery, the actin cytoskeleton, and H⁺-K⁺-ATPase recycling in the gastric parietal cell. *J Physiol* 532:287-296.
- Okamoto Y, Ninomiya H, Miwa S, Masaki T (2000) Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 275:6439-6446.
- Onaivi ES, Leonard CM, Ishiguro H, Zhang PW, Lin Z, Akinshola BE, Uhl GR (2002) Endocannabinoids and cannabinoid receptor genetics. *Prog Neurobiol* 66:307-344.
- Osawa S, Kajimura M, Yamamoto S, Ikuma M, Mochizuki C, Iwasaki H, Hishida A, Terakawa S (2005) Alteration of intracellular histamine H₂ receptor cycling precedes antagonist-induced upregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G880-889.
- Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, Ikeda JE (2003) ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12:1671-1687.
- Overly CC, Hollenbeck PJ (1996) Dynamic organization of endocytic pathways in axons of cultured sympathetic neurons. *J Neurosci* 16:6056-6064.
- Pacheco M, Childers SR, Arnold R, Casiano F, Ward SJ (1991) Aminoalkylindoles: actions on specific G-protein-linked receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 257:170-183.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Palmer SL, Thakur GA, Makriyannis A (2002) Cannabinergic ligands. *Chem Phys Lipids* 121:3-19.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1996) Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 49:707-714.

- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL (1998) SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca²⁺ currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol Pharmacol* 54:1064-1072.
- Parent JL, Labrecque P, Driss Rochdi M, Benovic JL (2001) Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A₂ receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J Biol Chem* 276:7079-7085.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305:1972-1975.
- Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22:9771-9775.
- Parnot C, Miserey-Lenkei S, Bardin S, Corvol P, Clauser E (2002) Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab* 13:336-343.
- Parnot C, Bardin S, Miserey-Lenkei S, Guedin D, Corvol P, Clauser E (2000) Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7615-7620.
- Parton RG, Simons K, Dotti CG (1992) Axonal and dendritic endocytic pathways in cultured neurons. *J Cell Biol* 119:123-137.
- Paton WD (1975) Pharmacology of marijuana. *Annu Rev Pharmacol* 15:191-220.
- Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3:311-320.
- Penela P, Ribas C, Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 15:973-981.
- Perrais D, Merrifield CJ (2005) Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev Cell* 9:581-592.
- Pertwee RG (1999) Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci* 65:597-605.
- Pertwee RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63:569-611.
- Pertwee RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76:1307-1324.
- Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, Bouvier M (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *Embo J* 21:1628-1637.
- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51:391-402.
- Pfeffer S (2005) A model for Rab GTPase localization. *Biochem Soc Trans* 33:627-630.

- Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:886-896.
- Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, MacKie K (2004) Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 127:101-112.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.
- Pietila EM, Tuusa JT, Apaja PM, Aatsinki JT, Hakalahti AE, Rajaniemi HJ, Petaja-Repo UE (2005) Inefficient maturation of the rat luteinizing hormone receptor. A putative way to regulate receptor numbers at the cell surface. *J Biol Chem* 280:26622-26629.
- Pin JP, Galvez T, Prezeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98:325-354.
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12:4122-4132.
- Pleasure SJ, Page C, Lee VM (1992) Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci* 12:1802-1815.
- Pollok-Kopp B, Schwarze K, Baradari VK, Oppermann M (2003) Analysis of ligand-stimulated CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation in intact cells using phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem* 278:2190-2198.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Prezeau L, Gomeza J, Ahern S, Mary S, Galvez T, Bockaert J, Pin JP (1996) Changes in the carboxyl-terminal domain of metabotropic glutamate receptor 1 by alternative splicing generate receptors with differing agonist-independent activity. *Mol Pharmacol* 49:422-429.
- Pula G, Mundell SJ, Roberts PJ, Kelly E (2004) Agonist-independent internalization of metabotropic glutamate receptor 1a is arrestin- and clathrin-dependent and is suppressed by receptor inverse agonists. *J Neurochem* 89:1009-1020.
- Pyne NJ, Waters C, Moughal NA, Sambhi BS, Pyne S (2003) Receptor tyrosine kinase-GPCR signal complexes. *Biochem Soc Trans* 31:1220-1225.
- Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z (2000) Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 57:746-752.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-194.
- Rinaldi-Carmona M, Le Duigou A, Oustric D, Barth F, Bouaboula M, Carayon P, Casellas P, Le Fur G (1998) Modulation of CB1 cannabinoid receptor functions after a long-term exposure

- to agonist or inverse agonist in the Chinese hamster ovary cell expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 287:1038-1047.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350:240-244.
- Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122:735-749.
- Roche JP, Bounds S, Brown S, Mackie K (1999) A mutation in the second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Mol Pharmacol* 56:611-618.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10:961-974.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci* 21:823-833.
- Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E, Larkin JM, Miller LJ (1995) Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol* 128:1029-1041.
- Roseberry AG, Hosey MM (1999) Trafficking of M(2) muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 274:33671-33676.
- Rosenfeld JL, Knoll BJ, Moore RH (2002) Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. *Receptors Channels* 8:87-97.
- Rosenkilde MM (2005) Virus-encoded chemokine receptors--putative novel antiviral drug targets. *Neuropharmacology* 48:1-13.
- Rosenthal W, Seibold A, Antaramian A, Lonergan M, Arthus MF, Hendy GN, Birnbaumer M, Bichet DG (1992) Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 359:233-235.
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH (2001) Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology* 40:221-232.
- Roth MG (2005) Timeline: Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Royle SJ, Murrell-Lagnado RD (2003) Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* 25:39-46.
- Rubino T, Vigano D, Zagato E, Sala M, Parolaro D (2000) In vivo characterization of the specific cannabinoid receptor antagonist, SR141716A: behavioral and cellular responses after acute and chronic treatments. *Synapse* 35:8-14.

- Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58:814-820.
- Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, Casti P, Vargiu R, Pani L (2003) Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 306:363-370.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 268:4625-4636.
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37:611-624.
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzman M (1998) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 54:834-843.
- Sandvig K, van Deurs B (1994) Endocytosis without clathrin. *Trends Cell Biol* 4:275-277.
- Santini F, Gaidarov I, Keen JH (2002) G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J Cell Biol* 156:665-676.
- Santucci V, Storme JJ, Soubrie P, Le Fur G (1996) Arousal-enhancing properties of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in rats as assessed by electroencephalographic spectral and sleep-waking cycle analysis. *Life Sci* 58:PL103-110.
- Savinainen JR, Saario SM, Niemi R, Jarvinen T, Laitinen JT (2003) An optimized approach to study endocannabinoid signaling: evidence against constitutive activity of rat brain adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 140:1451-1459.
- Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:565-572.
- Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 104:173-206.
- Scott MG, Benmerah A, Marullo S (2004) [G protein coupled receptor endocytosis]. *Med Sci (Paris)* 20:78-83.
- Scott MG, Benmerah A, Muntaner O, Marullo S (2002) Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J Biol Chem* 277:3552-3559.
- Seachrist JL, Ferguson SS (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* 74:225-235.
- Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS (2000) beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *J Biol Chem* 275:27221-27228.

- Seck T, Baron R, Horne WC (2003) Binding of filamin to the C-terminal tail of the calcitonin receptor controls recycling. *J Biol Chem* 278:10408-10416.
- Segal M (1983) Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *J Neurophysiol* 50:1249-1264.
- Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:381-416.
- Setou M, Hayasaka T, Yao I (2004) Axonal transport versus dendritic transport. *J Neurobiol* 58:201-206.
- Shapiro MJ, Coughlin SR (1998) Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1. *J Biol Chem* 273:29009-29014.
- Shapiro MJ, Trejo J, Zeng D, Coughlin SR (1996) Role of the thrombin receptor's cytoplasmic tail in intracellular trafficking. Distinct determinants for agonist-triggered versus tonic internalization and intracellular localization. *J Biol Chem* 271:32874-32880.
- Sheehan D, Ray GS, Calhoun BC, Goldenring JR (1996) A somatodendritic distribution of Rab11 in rabbit brain neurons. *Neuroreport* 7:1297-1300.
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* 278:14498-14506.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294:1307-1313.
- Shi SH, Jan LY, Jan YN (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112:63-75.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 270:3726-3731.
- Signoret N, Pelchen-Matthews A, Mack M, Proudfoot AE, Marsh M (2000) Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5. *J Cell Biol* 151:1281-1294.
- Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M (1997) Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* 139:651-664.
- Silverman MA, Kaech S, Jareb M, Burack MA, Vogt L, Sonderegger P, Banker G (2001) Sorting and directed transport of membrane proteins during development of hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7051-7057.

- Simons M, Ikonen E, Tienari PJ, Cid-Arregui A, Monning U, Beyreuther K, Dotti CG (1995) Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J Neurosci Res* 41:121-128.
- Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394:494-498.
- Slepnev VI, De Camilli P (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161-172.
- Sofer A, Schwarzmann G, Futerman AH (1996) The internalization of a short acyl chain analogue of ganglioside GM1 in polarized neurons. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):2111-2119.
- Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149:901-914.
- Staines WA, Morassutti DJ, Reuhl KR, Ally AI, McBurney MW (1994) Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters. *Neuroscience* 58:735-751.
- Star EN, Newton AJ, Murthy VN (2005) Real-time imaging of Rab3a and Rab5a reveals differential roles in presynaptic function. *J Physiol* 569:103-117.
- Steiner P, Sarria JC, Glauser L, Magnin S, Catsicas S, Hirling H (2002) Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD. *J Cell Biol* 157:1197-1209.
- Stowell JN, Craig AM (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* 22:525-536.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6775-6780.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Tanowitz M, von Zastrow M (2003) A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *J Biol Chem* 278:45978-45986.
- Tao Q, Aboud ME (1998) Mutation of a highly conserved aspartate residue in the second transmembrane domain of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, disrupts G-protein coupling. *J Pharmacol Exp Ther* 285:651-658.
- Tarasova NI, Stauber RH, Choi JK, Hudson EA, Czerwinski G, Miller JL, Pavlakis GN, Michejda CJ, Wank SA (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.

- Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2:599-605.
- Theriault C, Rochdi MD, Parent JL (2004) Role of the Rab11-associated intracellular pool of receptors formed by constitutive endocytosis of the beta isoform of the thromboxane A2 receptor (TP beta). *Biochemistry* 43:5600-5607.
- They M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7:947-953.
- Thomas A, Ross RA, Saha B, Mahadevan A, Razdan RK, Pertwee RG (2004) 6"-Azidohex-2"-yne-cannabidiol: a potential neutral, competitive cannabinoid CB1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 487:213-221.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13:238-250.
- Trimmer JS (1999) Sorting out receptor trafficking. *Neuron* 22:411-412.
- Tsao PI, von Zastrow M (2000) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 275:11130-11140.
- Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93:969-975.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.
- Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 135:913-924.
- Urs NM, Jones KT, Salo PD, Severin JE, Trejo J, Radhakrishna H (2005) A requirement for membrane cholesterol in the beta-arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA1 lysophosphatidic acid receptors. *J Cell Sci* 118:5291-5304.
- van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70:729-740.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005a) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med* 7:37-50.
- van der Stelt M, Di Marzo V (2005b) Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77:111-122.
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365:1389-1397.

- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.
- Vasquez C, Lewis DL (1999) The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *J Neurosci* 19:9271-9280.
- Vasquez C, Navarro-Polanco RA, Huerta M, Trujillo X, Andrade F, Trujillo-Hernandez B, Hernandez L (2003) Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 81:436-442.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4903-4908.
- Vickery RG, 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.
- Vilardaga JP, Steinmeyer R, Harms GS, Lohse MJ (2005) Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 1:25-28.
- Vilardaga JP, Bunemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* 21:807-812.
- Virgolini I, Yang Q, Li S, Angelberger P, Neuhold N, Niederle B, Scheithauer W, Valent P (1994) Cross-competition between vasoactive intestinal peptide and somatostatin for binding to tumor cell membrane receptors. *Cancer Res* 54:690-700.
- Vischer HF, Leurs R, Smit MJ (2005) HCMV-encoded G-protein-coupled receptors as constitutively active modulators of cellular signaling networks. *Trends Pharmacol Sci*.
- Volpicelli LA, Lah JJ, Levey AI (2001) Rab5-dependent trafficking of the m4 muscarinic acetylcholine receptor to the plasma membrane, early endosomes, and multivesicular bodies. *J Biol Chem* 276:47590-47598.
- Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1357-1366.
- Wang HY, Tao J, Shumay E, Malbon CC (2006) G-protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins: AKAP79 and AKAP250 (gravin). *Eur J Cell Biol*.
- Wang Y, Zhou Y, Szabo K, Haft CR, Trejo J (2002) Down-regulation of protease-activated receptor-1 is regulated by sorting nexin 1. *Mol Biol Cell* 13:1965-1976.
- Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359:133-136.

- West AE, Neve RL, Buckley KM (1997) Targeting of the synaptic vesicle protein synaptobrevin in the axon of cultured hippocampal neurons: evidence for two distinct sorting steps. *J Cell Biol* 139:917-927.
- Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297:615-620.
- Wieland T, Chen CK (1999) Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:14-26.
- Wiggin GR, Fawcett JP, Pawson T (2005) Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Dev Cell* 8:803-816.
- Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS, Caron MG (2002) Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry* 41:11981-11989.
- Willingham MC, Hanover JA, Dickson RB, Pastan I (1984) Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:175-179.
- Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG, Parton RG (2000) EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* 11:2657-2671.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678-682.
- Winckler B (2004) Scientiae forum / models and speculations pathways for axonal targeting of membrane proteins. *Biol Cell* 96:669-674.
- Winckler B, Mellman I (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23:637-640.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698-701.
- Wisco D, Anderson ED, Chang MC, Norden C, Boiko T, Folsch H, Winckler B (2003) Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons. *J Cell Biol* 162:1317-1328.
- Wojcikiewicz RJ (2004) Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci* 25:35-41.
- Xia S, Kjaer S, Zheng K, Hu PS, Bai L, Jia JY, Rigler R, Pramanik A, Xu T, Hokfelt T, Xu ZQ (2004) Visualization of a functionally enhanced GFP-tagged galanin R2 receptor in PC12 cells: constitutive and ligand-induced internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15207-15212.

- Xiang Y, Kobilka B (2003) The PDZ-binding motif of the beta2-adrenoceptor is essential for physiologic signaling and trafficking in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10776-10781.
- Yamazaki T, Selkoe DJ, Koo EH (1995) Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* 129:431-442.
- Zahniser NR, Sorkin A (2004) Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:80-91.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117.
- Zhang J, Ma Y, Taylor SS, Tsien RY (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14997-15002.
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274:10999-11006.
- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5780-5785.
- }