



HAL
open science

Implication de GASP-1 dans la modulation de l'activité des agonistes du récepteur bêta-2 adrénergique dans la fonction respiratoire

Alaa Abu-Helo

► **To cite this version:**

Alaa Abu-Helo. Implication de GASP-1 dans la modulation de l'activité des agonistes du récepteur bêta-2 adrénergique dans la fonction respiratoire. Pneumologie et système respiratoire. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ024 . tel-01374853

HAL Id: tel-01374853

<https://theses.hal.science/tel-01374853>

Submitted on 2 Oct 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
[Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242]

THÈSE présentée par :
[Alaa ABU-HELO]

soutenue le : 29/Septembre/2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

**Implication de GASP-1 dans la modulation de l'activité
des agonistes du récepteur bêta-2 adrénergique dans la
fonction respiratoire**

THÈSE dirigée par :

[Dr SIMONIN Frédéric]

Directeur de Recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

[Prof. DEVILLIER Philippe]

Professeur, Université Versailles Saint Quentin, Paris

[Prof. CHANEZ Pascal]

Professeur, Université de Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Prof. BUCHER Bernard]

Professeur, université de Strasbourg

Remerciements

Mes premiers remerciements sont pour les Professeurs Philippe DEMILLER et Pascal CHANEZ pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs, ainsi qu'au Docteur Bernard BUCHER en tant qu'examineur.

Merci au Docteur Frédéric SIMONIN pour tout ce qu'il m'a appris et pour m'avoir guidé durant ces années. Merci également à tous les membres de l'équipe : Khadija Elhabzi, Grégory Michel, Safia Ayachi, Sandra Lecat,

Merci à toute l'équipe du Docteur Nelly Frossard et à François Daubeuf pour leur participation au projet et leur aide.

Merci à tous mes amis pour leur soutien et leur aide : Olena Goriainova, Haider Karomi, Juliette Maarrawi, Ali Mahfoud, Isabelle Pfeifer, Rabih Chostine, Clair Ferret, Ayman Hazzouri, Sally Hassrouny, Saad Rochd...

Je tiens enfin à remercier mes parents pour leur soutien et leur confiance durant toutes ces années. Merci également à toute ma famille....

Table des Matières

I. INTRODUCTION	20
I.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G	21
I.1.1. Découverte des RCPG	22
I.1.2. Structure des RCPG	24
I. 1.4. Les protéines G hétérotrimériques	32
I.1.4.1. Les différents états d'activation des RCPG	36
I.1.4.2. Transduction du signal des RCPG	39
I.1.4.2.a. La famille des adénylates cyclases.....	40
I.1.4.2.b. stimulation de la phospholipase	41
I.1.4.2.c. Canaux.....	42
I.1.4.2.d. Autres effecteurs	42
I.1.5. Autres protéines interagissant avec les RCPG.....	42
I.1.5.a. Les GRK et la désensibilisation du signal induit par les RCPG	43
I.1.5.b. Les mécanismes d'internalisation des RCPG dépendants des β -arrestines	44
I.2. La protéine GASP-1	47
I.2.1. Identification de GASP	47
I.2.2. Description de la famille GASP	48
I.2.4. Publication 1	52
I.2.5. Discussion: la publication n°1	60
I.3. La régulation négative des RCPG.....	60
I.3.1. Ubiquitylation et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G ...	61
I.3.2 GASP-1 et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G	62

1.3.3 Alix et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G.....	62
I.4. L'asthme	63
I.4.1. Types de médicaments	63
1.4.2. Les récepteurs adrénergiques	64
I.4.2.1. Classification des récepteurs adrénergiques	65
I.4.2.2. Localisation des récepteurs adrénergiques.....	65
I.4.2.3. Les récepteurs de sous type $\alpha 1$ et $\alpha 2$	65
I.4.2.4. Les récepteurs $\beta 1$ cardiaques	66
I.4.2.5. Les récepteurs $\beta 2$ pulmonaires et des muscles lisses vasculaires	66
I.4.2.6. Caractéristiques des différents types de récepteurs et de leurs agonistes	67
I.4.2.7. Conséquences de l'activation des récepteurs bêta-adrénergiques.....	69
I.4.3. Récepteurs β -adrénergiques et traitement de l'asthme	70
II. OBJECTIFS DE LA THESE.....	72
III. MATERIEL ET METHODES	74
III.1. Origine des produits utilisés	75
III.2. Animaux	75
III.3. Génération des souris KO GASP-1	75
III. 4. Méthodes de mesure de la réactivité bronchique	76
III.4.1. Technique de l'oscillation forcée	76
III.4.2. Technique de la pléthysmographie.....	77
III.5. Protocoles des expérimentations animales	80
III.5.1. Administration des agonistes bêta2-adrénergiques	80
III.5.2. Effet aigu d'une seule dose de salbutamol sur la réactivité bronchique chez les souris sauvages.	80

III.5.3. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages..	81
III.5.4. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique des souris KO GASP1	82
III.5.5. Préparation des membranes à partir depoumons et quantification du nombre de sites bêta-adrénergiques par liaison à un ligand radioactif.....	82
III.5.6. Effet aigu du formotérol sur le nombre des récepteurs bêta-adrénergiques.....	83
III.5.7. Effet chronique du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris WT et KO GASP1	86
III.5.8. Mesure de la tolérance induite par administration chronique de formotérol	86
III.5.9. Effet chronique du formotérol sur le nombre des récepteurs bêta-adrénergiques	87
III.5.10. Mesure du collagène et de l'activité de la Myeloperoxidase dans le poumon...	87
III.5.11. Mesure de l'alpha actine du muscle lisse dans le poumon.....	88
III.5.12. Observation histologique et mesure de l'épaisseur du muscle lisse bronchique..	89
III.5.13. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la résistance de la trachée...	89
III.5.14. Analyses statistiques	90
III.6. Méthodes utilisées dans les expériences avec des cellules en culture.....	90
III.6.1. Les cellules utilisées.....	90
III.6.1.1. Culture de cellules musculaires lisses des voies aériennes humaines : les CML	90
III.6.1.2. Les cellules HEK293 et leur condition de culture.....	91
III.6.1.3. Congélation et décongélation	92
III.6.2. Evaluation de la présence des récepteurs bêta-2 adrénergiques dans les CML ...	92
III.6.3. Détection de l'expression de GASP-1 et de la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot.....	92
III.6.3.1. Les différents anticorps utilisés.....	92

III.6.3.2. Les tampons.....	93
III.6.3.3. Préparation des extraits protéiques pour analyse par Western Blot.....	94
III.6.3.4. Séparation des protéines par gel SDS-PAGE.....	94
III.6.3.5. Transfert des protéines sur membrane	95
III.6.3.6. Révélation des protéines d'intérêt	96
III.6.4. Mesure de la libération de calcium intracellulaire Ca ²⁺	96
III.6.5. Transfections	97
III.6.5.1. Les plasmides utilisés pour les tests de transfection des cellules CML	97
III.6.5.2. Amplification et purification des plasmides pour les transfections	100
III.6.5.3. Transfection des cellules avec la technologie 4D-Nucleofector	101
III.7. dosage de l'AMPC à l'aide du kit Lance Ultra (PerkinElmer)	101
IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	103
IV.A. Mise en place d'un modèle d'hyperréactivité bronchique induite par les agonistes bêta2-adrénérgique chez la souris et analyse du phénotype des souris KO GASP-1 dans ce modèle	104
IV.A.1. Mise en évidence de la présence ou de l'absence de GASP-1 dans les cerveaux et les poumons des animaux utilisés.	104
IV.A.2. Effet aigu du salbutamol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages	107
IV.A.3. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages	108
IV.A.4. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris KO GASP1	109

IV.A.5. Effet aigu du formotérol sur le nombre de récepteurs bêta-adrénergiques dans les poumons.	110
IV.A.6. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la réactivité bronchique chez les souris KO GASP1 par pléthysmographie	113
IV.A.7. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la réactivité bronchique chez les souris KO GASP1 par la technique de l'oscillation forcée	114
IV.A.8. Mesure de la tolérance induite par l'administration chronique de formotérol...	116
IV.A.9. Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur le taux de collagène, l'activité de la myéloperoxydase et l'alpha actine musculaire lisse dans les poumons de souris WT et KO GASP-1.	117
IV.A.10. Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur l'épaisseur de l'épithélium, le muscle lisse et le nombre de cellules dans les poumons chez les souris WT et KO GASP-1.	120
IV.A.11. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur le nombre de récepteurs bêta-adrénergiques dans les poumons de souris WT et KO GASP-1.	122
IV.A.12. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la tension de la trachée isolée des souris WT et KO GASP-1.....	124
IV.A.13. Conclusion et discussion sur les résultats obtenus dans le modèle d'hyperréactivité bronchique induite par le formotérol chez les souris sauvages et KO GASP-1.	126
IV.A.13.1. Analyse de la réactivité bronchique chez les souris WT et KO-GASP-1 après un traitement chronique avec un agoniste B2-AR.	126
IV.A.13.2. Expression de GASP-1 et du récepteur B2-AR.	127
IV.A.13.3. Le nombre de sites du récepteur B2-AR chez les souris WT et KO GASP-1	127

IV.B. Vers la mise en place d'un modèle cellulaire pour analyser le rôle de la protéine GASP1 dans l'activation prolongée du récepteur bêta-2 adrénergiques.....	128
IV.B.1. Expression des protéines GASP-1, GASP-2 et du récepteur B2-AR dans les cellules primaires de muscle lisse bronchique humain (CML).....	129
IV.B.1.1. Expression de la protéine GASP-1.....	129
IV.B.1.2. Expression du récepteur B2-AR dans les CML.....	130
IV.B.2. Tests de fonctionnalité du récepteur B2-adrénergique des cellules primaires CML : activation de l'adénylate cyclase et production d'AMPc.....	131
IV.B.3. Evaluation de la capacité du récepteur B2-AR des CML à activer la voie des MAP kinases.....	132
IV.B.4. Effet de l'activation prolongée du récepteur B2-AR sur les réponses calciques des récepteurs couplés aux protéines de type Gq dans les CML.....	134
IV.B.5. Optimisation de la transfection des cellules primaires CML.....	138
IV.B.6. Conclusion et discussion de la partie sur la mise au point du système cellulaire.....	140
IV.C. Conclusion générale.....	141
V. Références bibliographiques.....	142

Liste des Tableaux et Figures

Figure 1: Les différents partenaires impliqués dans la transduction du signal via les récepteurs couplés aux protéines G	22
Figure 2: Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines-G.....	26
Figure 3: Les 3 principales familles de RCPG.....	29
Figure 4: Les différentes classes de RCPG.....	32
Figure 5: Modifications post-traductionnelles des protéines G.....	33
Figure 6: Structure tridimensionnelle schématique de la rhodopsine et de sa protéine G associée, la transducine.....	34
Figure 7: Cycle d'activation – inactivation des protéines G.....	36
Figure 8: Les différents modèles d'activation des RCPG.....	39
Figure 9: Protéines G hétérotrimériques et leurs.....	40
Figure 10: Structure de l'adénylate cyclase de type II.....	41
Figure 11: schématique des étapes majeures de l'adaptation à la stimulation des RCPG.....	46
Figure 12: La famille des protéines GASP.....	49
Figure 13: Rôle du muscle lisse des voies aériennes dans la pathogenèse de l'asthme.....	64
Figure 14: Schéma de la structure cristallographique du récepteur β_2 adrénergique	67
Tableau 1: Caractéristiques des principaux types de récepteurs adrénergiques....	67
Figure 15: Organisation périphérique schématique du système orthosympathique.....	69
Figure 16: Schéma de la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G.....	70
Figure 17: Implication de la voie de signalisation du récepteur β_2 -AR dans la relaxation du muscle lisse bronchique.....	71
Figure 18: Flexivent® : méthode d'oscillation forcée de la mesure de la fonction pulmonaire.....	77
Figure 19: Flexivent® : méthodes d'oscillation forcée de la mesure de la fonction pulmonaire.....	78
Figure 20 : photographie des chambres du pléthysmographe.....	79

Figure 21: représentation schématique des paramètres pris en compte par l'index Penh.....	80
Figure 22: Détermination des valeurs de Ki pour lessouris contrôles saline WT et KO GASP1.....	85
Tableau 2: moyennes des valeurs de Ki pour les ligands CGP 20712 et ICI 118551.....	85
Figure 23: Vecteurs d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo.....	98
Figure 24: Vecteur d'expression eucaryote pmaxGFP.....	99
Figure 25: Vecteur d'expression pcDNA3 YFP-GASP1.....	100
Figure 26: Dosage de l'AMPc à l'aide du kit Lance Ultra.....	102
Figure 27: Mise en évidence de la présence ou de l'absence de GASP-1 dans les cerveaux et les poumons des souris WT et KO GASP-1 par Western blot.....	105
Figure 28 :Effet de l'administration intranasale aiguë de salbutamol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris C57BL6J/SV129.....	108
Figure 29: Effet aigu du formotérol chez les souris WT 50% C57BL6/50%SV129.....	109
Figure 30:Effet de l'administration intranasale aiguë de formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO GASP-1.....	110
Figure 31: Quantification du nombre de sites B-AR après l'administration aiguë du formotérol chez les souris WT et KO GASP1.....	112
Figure 32: Effet de l'administration intranasale chronique (28 jours) du formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO GASP1.....	114
Figure 33: Effet de l'administration intranasale chronique du formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO Gasp1.....	115
Figure 34: Effet bronchodilatateur d'une dose de formotérol après un traitement chronique au formotérol dans les souris WT et KO GASP-1.....	117
Figure 35:Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur le collagène, l'activité de la myelopéroxydase et l'alpha actine musculaire lisse dans les poumons des souris WT et KO GASP1.....	119

Figure 36: Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur l'épaisseur de l'épithélium, le muscle lisse et le nombre de cellules dans les poumons chez les souris WT et KO Gasp1.....	121
Figure 37: Quantification du nombre de sites B-AR après l'administration chronique du formotérol chez les souris WT et KO GASP1.....	123
Figure 38: Effet de l'acétylcholine sur la trachée isolée de souris WT et KO GASP-1 traitées de manière chronique au formotérol.....	125
Figure 39: Mise en évidence de l'expression endogène de GASP-1 et GASP-2 dans les CML par Western blot.....	130
Figure 40: Expression endogène des récepteurs B1 et B2-AR dans les CML.....	131
Figure 41: Production d'AMPC par les CML stimulées avec le formotérol ou la forskoline.....	132
Figure 42: Activation de la voie des MAP kinases par le formotérol dans les CML.....	134
Figure 43 : Comparaison de la concentration de calcium intracellulaire dans les CML après activation par la bradykinine ,la thrombine ou l'histamine.....	135
Figure 44: Réponse calcique des CML à la bradykinine et à la thrombine avec ou sans prétraitement au formotérol.....	137
Figure 45: Cellules CML transfectées avec les plasmides pmaxGFP, pcDNA3-14-3-3-mYFP et pcDNA3-YFP-GASP-1.....	139

Abréviations

AC : adénylate cyclase

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

β2AR : récepteur à l'adrénaline β2

CB1 : récepteur aux cannabinoïdes de type 1

CB2 : récepteur aux cannabinoïdes de type 2

CHO : cellule issue d'ovaire de hamster chinois (chinese hamster ovary)

CXCR2 : récepteur aux chemokines à motif CXC de type 2

CXCR4 : récepteur aux chemokines à motif CXC de type 4

D1A : récepteur à la dopamine de type 1A

D2 : récepteur à la dopamine de type 2

DAG : diacylglycérol

DOR : récepteur aux opioïdes δ

FSH : hormone folliculostimulante (follicle stimulating hormone)

GABAB : récepteur à l'acide γ amino-butyrrique

GAP : protéine activatrice de GTPase (GTPase-activating protein)

GASP : protéine de tri associée aux RCPG (G protein-coupled receptor associated sorting protein)

GDP : guanosine diphosphate

GIP : gastric inhibitory polypeptide

GIRK : G protein activated Inwardly Rectifying K⁺

GLP-1R et GLP2-R : glucagon like peptide-1/2

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GRK : kinase spécifique des RCPG (G protein-coupled receptor kinase)

GST : glutathione S-transferase

GTP : guanosine triphosphate

GHRH : growth hormone releasing hormone

HEK: Cellule issue de reins d'embryon humain (human embryonic kidney)

ICL : IntraCellular loop

KO : knock-out

LABA : Long-acting beta agonists

LH : hormone lutéinisante (luteinizing hormone)

LGR : Leucine rich repeats containing GPCR

M1 à M5 : récepteurs à l'acétylcholine muscarinique de type 1, 2, 3, 4 et 5

MAPK : protéine kinase activée en cascade (mitogen-activated protein kinase)

MOR : récepteur aux opioïdes μ

MVB : corps multi-vésiculaire

NHERF : facteur régulateur de l'échangeur Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchange regulatory factor)

NK1 : récepteur à la substance P

NK2 : récepteur à la neurokinine A

NK3 : récepteur à la neurokinine B

PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)

PAR1 : récepteur activé par la thrombine de type 1 (protease activated receptor 1)

PAR2 : récepteur activé par la thrombine de type 2 (protease activated receptor 2)

PDZ : post-synaptic density protein of 95-kDa/drosophila disc large tumour suppressor (DlgA)/zonula occludens 1 homology

Per : Period

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKA : protéine kinase dépendante du cAMP

PKC : protéine kinase dépendante du DAG

PLC β : phospholipase C β

RAIG :retinoic acid-inducible orphan GPCR

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

SNX1 : sorting nexin 1

SNX1 : sorting nexin 1

TM : Domaine transmembranaire

TSH : thyrostimuline (thyroxin stimulating hormone)

TXA2 α : récepteur au thromboxane A2 de type α

Ub : ubiquitine

V2 : récepteur à la vasopressine de type 2

VIP : peptide intestinal vasoactif (vasoactive intestinal peptide)

WT : wild-type

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment l'une des plus grandes familles de protéines codées par le génome humain. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus physiologiques et représentent des cibles pharmacologiques majeures. Plus de 30% des médicaments actuellement sur le marché ciblent les RCPG. Notre équipe s'intéresse aux mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent les réponses adaptatives liées à la stimulation chronique des RCPG. Récemment, nous avons identifié une nouvelle famille de protéines interagissant avec les RCPG, les protéines GASP pour « G protein-coupled receptor Associated Sorting Protein » (Abu-Helo & Simonin 2010; Simonin *et al.*, 2004). Il a été proposé que ces protéines moduleraient le trafic intracellulaire des RCPG après endocytose provoquée par les ligands. L'objectif de notre équipe est de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la régulation de l'activité et du trafic intracellulaire des RCPG et les conséquences fonctionnelles de l'interaction GASP-RCPG. Dans ce contexte, nous avons concentré mon projet de thèse sur l'interaction de la protéine GASP-1 avec le récepteur bêta2-adrénergique (Bœuf *et al.*, 2009). Lors d'une étude préliminaire, nous avons montré que GASP-1 et GASP-2 pouvaient interagir avec de nombreux RCPG dont le récepteur adrénergique bêta-2. *In vivo*, ce récepteur module de nombreuses fonctions physiologiques dont la fonction respiratoire. Il représente une cible importante de médicaments utilisés dans le traitement de l'asthme (bêta-2 mimétiques). Afin d'étudier l'implication de GASP-1 dans la régulation de l'activité de ce récepteur, nous avons utilisé une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* (Bœuf *et al.*, 2009).

Les agonistes du récepteur bêta2-adrénergique sont des bronchodilatateurs puissants. Ils représentent des outils thérapeutiques majeurs dans le traitement de l'asthme. Dans les années 80-90, une recrudescence de mort par asthme a été observée; elle a été reliée à l'utilisation au long cours, en monothérapie, d'agonistes bêta2-adrénergiques en particulier d'agonistes de longue durée d'action (LABA) alors commercialisés (Sears *et al.*, 1994). Plus récemment, une méta-analyse incluant différents essais cliniques a confirmé que des patients traités pendant quatre semaines ou plus avec le formotérol (un agoniste de type LABA) présentaient un risque significativement plus élevé d'effet secondaire grave (Cates and Cates 2012) et pourraient présenter un risque plus élevé de mort par asthme (Wijessinghe *et al.*, 2009). Ces problèmes ont été reliés à un remaniement du muscle lisse bronchique et au développement d'une hyper-réactivité bronchique directement générés par le formotérol.

L'équipe du Dr F Simonin, dans laquelle je fais ma thèse, a identifié une nouvelle famille de protéines de fonction inconnue interagissant avec les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), les protéines GASP (Abu-Helo & Simonin 2010; Simonin *et al.*, 2004). Le premier membre de la famille, GASP-1, interagit avec plusieurs RCPG dont le récepteur bêta2-adrénergique. Mon projet de thèse consiste à étudier l'implication de la protéine GASP-1 dans l'hyper-réactivité bronchique induite par les agonistes bêta2-adrénergiques en comparant des souris sauvages et des souris génétiquement déficientes pour la protéine GASP-1 (KO GASP-1) qui ont été générées au laboratoire.

En collaboration avec l'équipe du Dr N. Frossard (spécialisée dans l'étude de la fonction respiratoire), nous avons mis au point et validé un modèle murin de traitement par les agonistes bêta2-adrénergiques chez la souris dans lequel sont étudiés i) les effets bronchodilatateurs aigus des agonistes bêta2-adrénergiques ainsi que ii) l'hyper-réactivité bronchique et le remaniement du muscle lisse bronchique associés à un traitement chronique (35 jours) par ces agonistes. Dans ce modèle, la réactivité bronchique des animaux est évaluée à l'aide de deux techniques différentes. L'une, consiste à mesurer la réactivité bronchique chez l'animal vigile à l'aide d'un pléthysmographe barométrique. L'autre, mesure directement la réactivité des voies aériennes chez l'animal anesthésié (technologie Flexivent®). Par ailleurs, nous avons associé ces mesures physiologiques à des mesures biochimiques et des coupes histologiques réalisées sur les poumons des animaux prélevés en fin d'expérience.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'effet bronchodilatateur aigu du formotérol n'est pas différent entre les souris sauvages et KO GASP-1. De manière intéressante, nous avons ensuite observé qu'un traitement chronique de 35 jours par le formotérol administré par voie intranasale induit le développement d'une réactivité bronchique exagérée (par comparaison aux contrôles non-traités) chez les animaux sauvages mais pas chez les KO GASP-1. Par ailleurs, nous avons observé que le développement de cette hyper-réactivité bronchique est corrélée à une augmentation du niveau de collagène dans les poumons des souris sauvages qui n'est pas observée chez les KO GASP-1. Ce résultat est confirmé par l'observation de coupes histologiques qui révèlent un remaniement du muscle lisse bronchique chez les animaux sauvages mais pas chez KO GASP-1.

Par la suite nous avons initié des travaux afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire à l'origine de l'absence d'hyper-réactivité bronchique observée chez les KO GASP-1. Comme un rôle de la protéine GASP-1 dans la dégradation lysosomale des RCPG a été proposé (Whistler *et al.*, 2002), nous avons mesuré le nombre de récepteurs bêta2-adrénergiques dans les poumons des animaux ayant subi un traitement chronique par le

formotérol. Nous avons pas observé de différences entre les animaux sauvages et KO GASP-1, ce qui suggère que, dans ce contexte pathophysiologique, GASP-1 n'est pas impliqué dans la dégradation des récepteurs bêta2-adrénergiques. Plusieurs publications récentes suggèrent que l'hyper-réactivité bronchique observée sur l'animal entier serait due à une modification de la signalisation du récepteur bêta-2 adrénergique dans les cellules du muscle lisse bronchique (Nino *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Nous avons initié des travaux pour évaluer la contribution de GASP-1 à la signalisation de ce récepteur dans des cellules de muscle lisse bronchique humain en culture.

Dans l'ensemble, ces travaux nous ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, le rôle de GASP-1 dans les adaptations liées à la stimulation chronique des RCPG et en particulier du récepteur b2-adrénergique, identifiant ainsi une cible potentielle pour limiter les effets indésirables des traitements chroniques par les agonistes de ce récepteur dans le traitement de l'asthme.

Abstract

The G-protein coupled receptors (GPCRs) constitute one of the largest families of proteins encoded by the human genome. These receptors are involved in the regulation of many physiological processes and are major drug targets. More than 30% of drugs currently on the market target GPCRs. Our team focuses on the molecular and cellular mechanisms underlying adaptive responses related to chronic stimulation of GPCRs. Recently, we identified a new family of proteins that interact with GPCRs, protein GASP "G protein-coupled receptor Associated Sorting Protein" (Abu-Helo & Simonin 2010; Simonin et al., 2004). It was proposed that these proteins modulate intracellular trafficking of GPCRs after endocytosis induced by ligands. The goal of our team is to better understand the role of these proteins in regulating the activity and intracellular trafficking of GPCRs and functional consequences of the interaction GASP-GPCRs. In this context, we focused my thesis project on the interaction of GASP-1 protein with the beta2-adrenergic receptor (Boeuf et al., 2009). In a preliminary study, we have shown that GASP-1 and GASP-2 can interact with many GPCRs including the adrenergic receptor beta-2. In vivo, this receptor modulates different physiological functions including the respiratory function and represents an important target for drugs used in the treatment of asthma (beta-2 agonists). To investigate the involvement of GASP-1 in regulating the activity of this receptor, we used a combination of approaches in vitro and in vivo (Boeuf et al., 2009).

Beta2-adrenergic agonists are potent bronchodilators and represent major therapeutic tools in the treatment of asthma. In 80-90 years, a resurgence of death from asthma was observed, which has been linked to long-term use in monotherapy of beta2-adrenergic agonists in particular long-acting beta2 agonists (LABA) then marketed (Sears et al., 1994). More recently, a meta-analysis including various clinical trials confirmed that patients treated for four weeks or more with formoterol (LABA agonist type) had a significantly higher risk of serious side effects (Cates and Cates 2012). These problems were related to a reorganization of the airway smooth muscle and the development of airway hyperresponsiveness generated directly by chronic administration of formoterol.

The team of Dr. Simonin F, in which I did my PhD, has identified a new family of proteins of unknown function that interacts with the G protein-coupled receptors (GPCRs), the GASP proteins (Abu-Helo & Simonin 2010; Simonin et al., 2004). The first member of the family, GASP-1 interacts with several GPCRs including beta2-adrenergic receptor. My

thesis project was to study the involvement of the protein GASP-1 in bronchial hyperresponsiveness induced by beta2-adrenergic agonists by comparing wild-type mice and GASP-1 genetically deficient mice (GASP-1 KO), which were generated in the laboratory. In collaboration with the team of Dr. N. Frossard (specialized in the study of respiratory function), we have developed and validated a murine model of treatment with beta2-adrenergic agonists in mice in which we have studied i) acute bronchodilators beta2-adrenergic effects and ii) bronchial hyperreactivity and remodeling of the airway smooth muscle associated with chronic treatment (35 days) by these agonists. In this model, we assessed the bronchial responsiveness of the animals by using two different techniques. The first one allows measuring bronchial responsiveness in the vigil animals by using a barometric plethysmograph while the other one, directly measures airway responsiveness in anesthetized animals (Flexivent® technology). In addition, we combined these physiological measurements with biochemical investigations and histological sections performed on the lungs of animals taken at the end of experiments.

At first, we showed that the acute bronchodilator effect of formoterol is not different between wild-type and GASP-1 KO mice. Interestingly, we then observed that chronic treatment with formoterol 35 days administered intranasally induces the development of an exaggerated bronchial reactivity (compared to untreated controls) in wild-type animals but not in GASP-1 KO. Furthermore, we observed that the development of this bronchial hyperresponsiveness correlated with an increase in collagen levels in the lungs of wild-type mice that was not observed in GASP-1 KO animals. This result was confirmed by the observation of histological sections revealing a redesign of bronchial smooth muscle in wild-type but not GASP-1 KO animals. We further initiated work to better understand the molecular mechanism underlying the absence of bronchial hyperresponsiveness observed in GASP-1 KO. As a role of the GASP-1 protein in lysosomal degradation of GPCRs has been proposed (Whistler et al., 2002), we measured the number of beta2-adrenergic receptors in the lungs of animals subjected to chronic treatment with formoterol. We did not observe any differences between wild-type and GASP-1 KO animals, suggesting that in this pathophysiological context, GASP-1 is not involved in the degradation of beta2-adrenergic receptors. Several recent publications suggest that the bronchial hyperresponsiveness observed in the whole animal is due to a change in beta-2 adrenergic receptor signaling in cells from the airway smooth muscle (Nino et al., 2009; Yang et al., 2011). We therefore initiated work to assess the contribution of GASP-1 in beta-2 adrenergic receptor signaling in primary human bronchial smooth muscle cells in culture.

Overall, this work has allowed us to demonstrate, for the first time, the role of GASP-1 in adaptations related to chronic stimulation of GPCRs and in particular the beta2-adrenergic receptor, thereby identifying a potential target for limiting the adverse effects of chronic treatment with agonists of this receptor in the treatment of asthma.

I. INTRODUCTION

I.1. Les Récepteurs Couplés aux Protéines G

La membrane plasmique d'une cellule forme une barrière séparant le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Or, des nutriments et de nombreuses informations doivent être captés et transmis par les cellules cibles de l'organisme. C'est pourquoi les membranes cellulaires, en plus d'accepter sous certaines conditions des transferts passifs de certaines molécules, présentent à leur surface des protéines spécifiques capables d'assurer différentes fonctions. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) en font partie et constituent l'une des plus grandes familles de protéines. Chez les mammifères, ils représentent 5% des protéines cellulaires totales et plus de 2% du génome humain. Ces récepteurs peuvent répondre à de multiples ligands, tels que des phéromones, des peptides, des hormones, des protéines telles que des facteurs de croissance, des photons, des ions. (Figure 1). Bien qu'aujourd'hui il a été montré que certaines voies de signalisation des RCPG ne passent pas par la protéine G, la plupart des effets cellulaires associés aux RCPG s'opèrent en stimulant l'échange du GDP par le GTP sur la sous-unité alpha des protéines G, ce qui constitue une étape clef du cycle d'activation des protéines G. Ces protéines G sont hétérotrimériques : elles sont composées d'une sous-unité $G\alpha$ à activité GTPasique et de deux sous-unités $G\beta/\gamma$ indissociables. Les RCPG contrôlent, au travers de l'activation des protéines G après fixation d'un ligand agoniste sur le récepteur, le déclenchement de plusieurs cascades de signalisation en modulant l'activité de différents effecteurs tels que des enzymes (adénylate cyclases, phosphodiésterases, phospholipases, etc.), des canaux ioniques (Ca^{2+} , K^+), des transports vésiculaires et des kinases (Figure 1).

La présence des RCPG à la membrane est finement régulée, notamment par le processus d'internalisation à la suite de la stimulation par un agoniste. Pour une majorité de RCPG étudiés, ce processus d'internalisation fait intervenir deux protéines cytoplasmiques, les β -arrestines qui jouent le rôle de protéines d'échafaudage en connectant les récepteurs à la machinerie d'endocytose de la cellule. Il a été découvert récemment que les β -arrestines sont aussi capables de recruter un grand nombre de protéines de la signalisation permettant aux récepteurs d'émettre un signal indépendamment des protéines G. La découverte de ligands dits « biaisés » capables d'activer sélectivement les voies de signalisation dépendantes des protéines G ou des β -arrestines a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la pharmacologie des RCPG et du développement de nouvelles molécules thérapeutiques (Marinissen & Gutkind, 2001).

Les RCPG sont impliqués, directement ou indirectement, dans la modulation de processus physiologiques très variés comme la vision, l'olfaction, la digestion, l'immunité, la nociception ou la croissance cellulaire.

Nombreux, diversifiés et multifonctionnels, ces récepteurs interviennent aussi dans les mécanismes de maintes physiopathologies, telles que cancers, troubles neurologiques et cardiovasculaires, infections bactériennes et virales... Leur dynamique alors, en tant que facteurs de dérèglements, peut résulter de mutations ou de surexpression de leur activité. De par l'importance de leur rôle dans la genèse de nombreuses pathologies, les RCPG sont très largement visés par la pharmacologie, où ils entrent pour environ 50% des médicaments actuellement sur le marché (Marinissen & Gutkind, 2001).

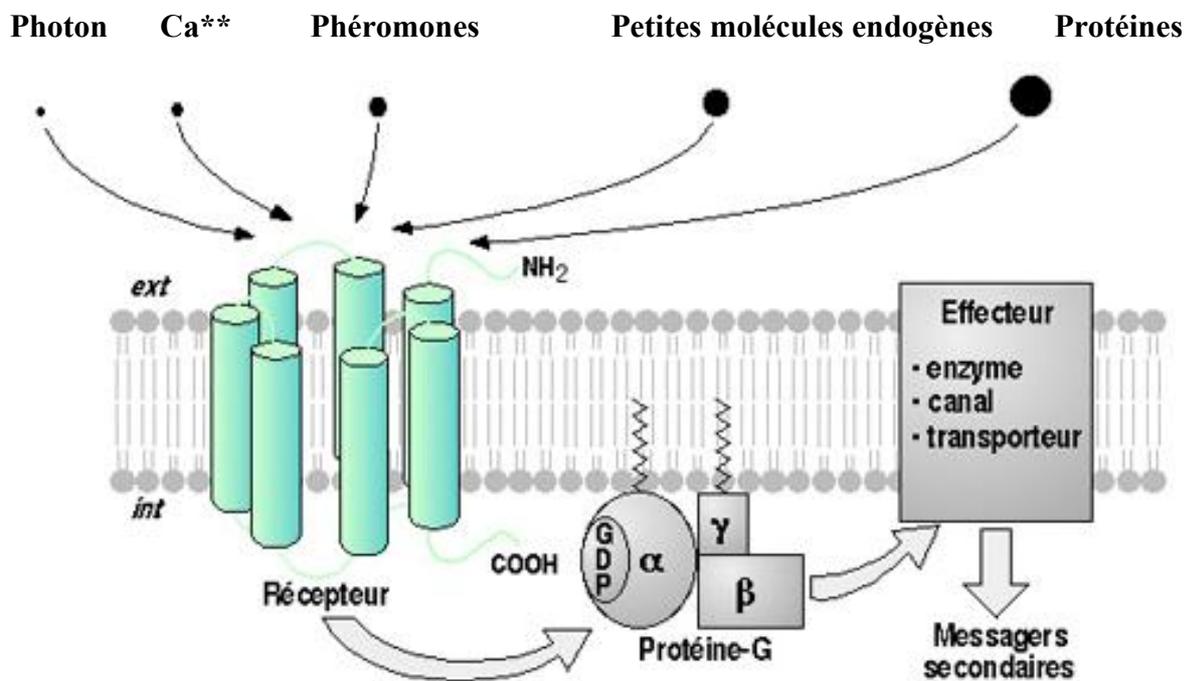


Figure 1 : Les différents partenaires impliqués dans la transduction du signal via les récepteurs couplés aux protéines G
Schéma selon (Bockart, 1996).

I.1.1. Découverte des RCPG

Jusqu'à la seconde moitié du 19^{ème} siècle, l'efficacité et la spécificité de l'action de molécules telles que la morphine ou la quinine, demeurent vaguement expliquées, notamment par la puissance chimique et l'affinité pour certains organes ou tissus. C'est seulement à partir de 1860 que la relation entre la structure chimique d'une molécule et son effet pharmacologique est étudiée systématiquement. Paul Ehrlich, immunologiste Berlinoise a été l'un des premiers à développer une théorie autour de l'idée de récepteur. C'est ainsi qu'en 1878, ses travaux l'amènent à supposer l'existence d'une entité chimique spécifique de la cellule qui serait responsable du marquage sélectif des colorants cellulaires (Ehrlich, 1956). Vingt ans plus tard, se fondant sur l'hypothèse que des « chaînes latérales » de la cellule pourraient lier certaines toxines (Ehrlich, 1957 a), il développera la « théorie des chaînes latérales » (side-chain theory) des toxines. Il évoquera ensuite l'idée selon laquelle il existe de nombreuses chaînes latérales, et à ce terme de « chaîne latérale » il substituera celui de « récepteur » (Ehrlich, 1957 b). De son côté, dans le cadre de son travail relatif à l'action de la nicotine et du curare sur la contraction musculaire, le physiologiste britannique John Newport Langley développe, en 1905, l'idée d'une « substance réceptive » (Langley, 1905). A la fin des années 1930, le pharmacologiste Alfred Joseph Clark pose les bases de l'analyse pharmacologique moderne en apportant une approche quantitative à l'effet des drogues. En effet, de par des calculs de taille moléculaire et de surface cellulaire, Clark déduit que des drogues comme l'adrénaline et l'acétylcholine se lient avec certains récepteurs spécifiques mais minoritairement exprimés à la surface des cellules cardiaques. Ces études conduiront Clark à conclure que l'action pharmacologique d'un composé est directement proportionnelle au nombre de récepteurs occupés (Clark, 1933). L'introduction des ligands radio-marqués, durant dans les années 1970, ouvre la porte de l'ère moléculaire de la recherche sur les récepteurs, en apportant des données sur la régulation du nombre de récepteurs ainsi que sur le mode de liaison du ligand au récepteur.

Mais ce n'est qu'en 1979 qu'intervient la découverte matérielle des récepteurs. Cette découverte résulte des travaux de l'équipe de Robert J. Lefkowitz qui, par chromatographie d'affinité, purifia le récepteur β 2-adrénergique. Et en 1986, la même équipe parviendra, en collaboration avec des chercheurs de Merck, à cloner le gène et l'ADNc du récepteur β 2-adrénergique (Dixon *et al.*, 1986).

L'analyse de la séquence du récepteur β 2-adrénergique révèle de nombreuses similarités avec une autre protéine, la rhodopsine bovine qui, à l'époque, constitue le modèle d'étude des protéines membranaires. Cette homologie de séquence entre le récepteur β 2-adrénergique et la rhodopsine bovine suggère que ces deux protéines partagent une structure très similaire et fait

ainsi naître l'idée d'une famille de gènes codant pour des récepteurs membranaires. Cette découverte marque le début de la recherche sur les RCPG et sera suivie par le clonage de nombreux autres gènes codant pour ces récepteurs, renforçant l'idée de l'existence d'une superfamille de gènes codant pour les RCPG.

De récentes études révèlent aujourd'hui l'existence d'environ 900 gènes codant pour des RCPG : 400 seraient des récepteurs capables de lier des ligands endogènes, et 500 seraient des récepteurs gustatifs et olfactifs (Schioth&Fredriksson, 2005). Mais en l'état actuel des connaissances on estime à une centaine le nombre de RCPG toujours sans ligand associé – dits « RCPG orphelins » (Chung *et al.*, 2008). Il convient cependant de souligner que dans le domaine des RCPG le champ de la recherche reste largement ouvert et prometteur : la découverte incessante de nouveaux peptides et l'existence de nombreux récepteurs orphelins laissent en effet augurer de nombreuses découvertes à venir.

I.1.2. Structure des RCPG

L'un des RCPG les plus étudiés à compter des années 1950 a été la rhodopsine bovine, qui est présente en très grande concentration dans la rétine des bovins. La rhodopsine bovine a pu être isolée, et de nombreuses études visant à déterminer sa structure ont été menées. A cet égard, des expériences de dichroïsme circulaire effectuées en 1977 ont permis d'établir que la rhodopsine est constituée d'environ 30% d'hélices. Par ailleurs, on a pu observer que les extrémités N-terminale et C-terminale se situent de part et d'autre de la membrane plasmique, et que la majeure partie de la rhodopsine se présente comme une protéine insérée dans la membrane grâce à sept hélices transmembranaires (Rafferty *et al.*, 1977). L'isolement et l'analyse de la séquence du gène de la rhodopsine bovine interviennent en 1983 et permettent de construire la carte d'hydrophobicité de la protéine montrant six domaines hydrophobes transmembranaires (Nathans& Hogness, 1983). En 1975, l'équipe d'Unwin établit le rapprochement avec la structure à sept domaines transmembranaires de la bactériorhodopsine, qui avait été cristallisée à une résolution de 7Å (Henderson & Unwin,1975). Dans les années 1990, les premiers cristaux en deux dimensions de la rhodopsine bovine sont disponibles et, grâce à l'application de la microscopie électronique à ces cristaux, la structure en sept domaines transmembranaires est identifiée en créant une projection de la protéine dans une bicouche lipidique. Un véritable bond en avant est réalisé en 2000 par Palczewski, avec l'obtention du cristal en trois dimensions avec une forte résolution (2,8Å) de la rhodopsine

bovine (Palczewski *et al.*, 2000). Il faudra attendre 2007, pour que les groupes de Kobilka et Stevens réussissent à obtenir le cristal du premier RCPG non visuel, le récepteur β 2-adrénergique avec une résolution de 3,4Å-3,7Å (Palczewski *et al.*, 2000). Les auteurs notent une différence structurale entre le β 2-adrénergique et la rhodopsine principalement au niveau de l'interaction entre l'extrémité cytoplasmique des domaines transmembranaires 3 et 6 et de la seconde boucle extracellulaire (Rasmussen *et al.*, 2007). Un an plus tard, deux autres cristaux de RCPG seront obtenus : le récepteur β 1-adrénergique et le récepteur adénosine A2A (Warne *et al.*, 2008; Jaakola *et al.*, 2008). La cristallisation, ces dernières années, de récepteurs autres que la rhodopsine, a permis de conforter les données indirectes d'ores et déjà obtenues, et a considérablement amélioré la compréhension des mécanismes d'activation des RCPG ainsi que des modes de liaison des ligands aux récepteurs (Rasmussen *et al.*, 2007).

La comparaison des séquences des RCPG révèle une topologie membranaire commune : sept segments hydrophobes transmembranaires en hélice, particulièrement bien conservés et composés chacun d'environ 25 à 35 acides aminés. Ces segments transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires. Les extrémités N-terminale et C-terminale se situent respectivement du côté extracellulaire et intracellulaire. Les boucles extracellulaires 1 et 2 présentent toutes deux une cystéine, qui peut former un pont disulfure. L'extrémité carboxy-terminale possède un site possible de palmitoylation après la courte hélice 8 située directement à la sortie du domaine transmembranaire 7. Ce site de modification post-traductionnel représente un ancrage lipidique dans la membrane, pouvant, ainsi, créer une quatrième boucle intracellulaire (Figure 2). D'importantes variations de taille dans la longueur des extrémités amino-terminale et carboxy-terminale, ainsi que des boucles, permettent de différencier les RCPG constituant un des critères qui a permis de caractériser les différentes familles de RCPG.

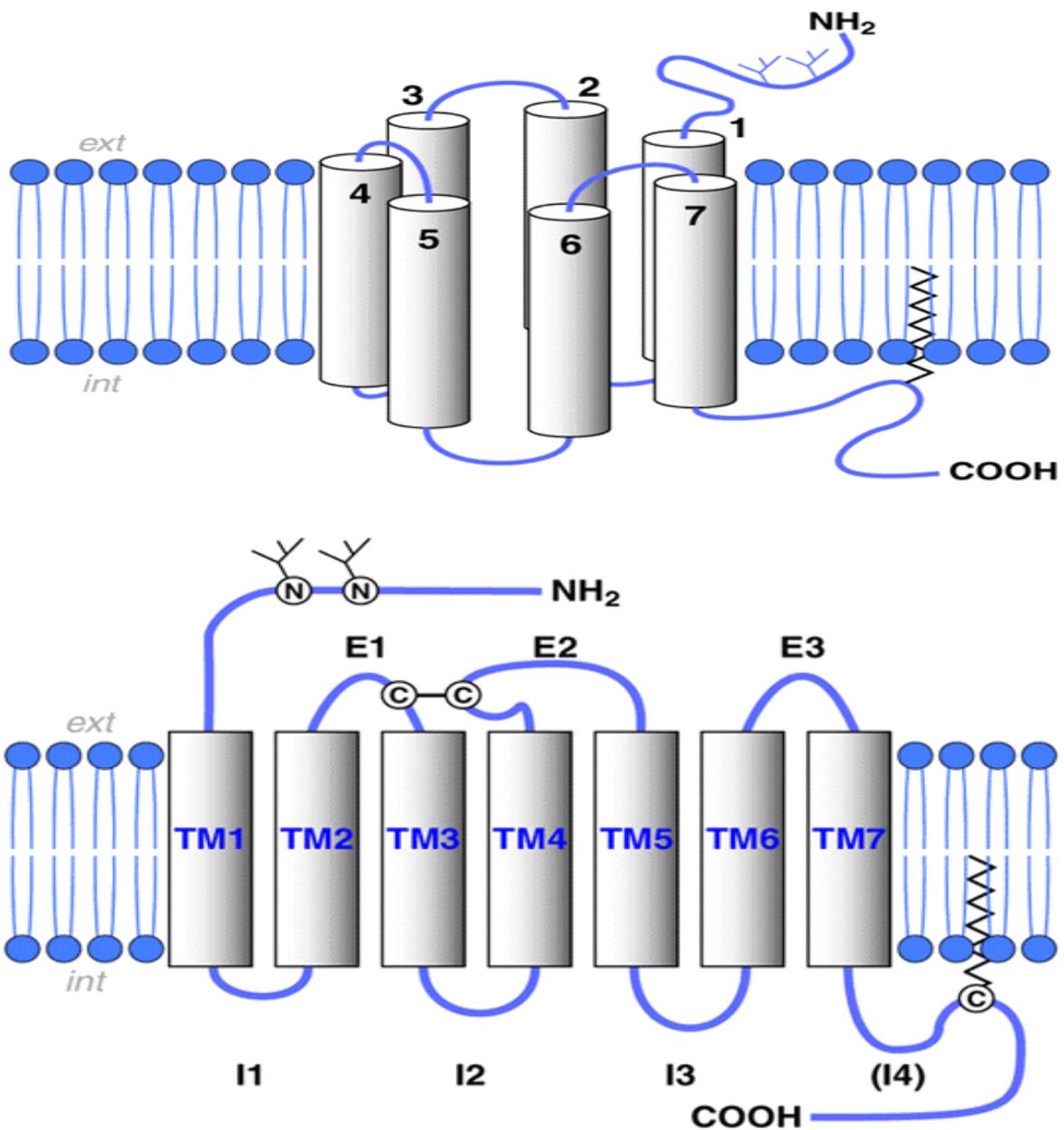


Figure 2 : Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines-G.

Représentation schématique d'un RCPG, en deux dimensions. (Ehrlich,1956). Les sept domaines transmembranaires hydrophobes (TM1 à TM7), sont reliés par trois boucles intracellulaires (I1, I2, I3) et trois extracellulaires (E1, E2, E3). Un pont disulfure relie E1 à E2. L'extrémité amino-terminale (NH₂) est extracellulaire, l'extrémité carboxy-terminale (COOH) est intracellulaire. Cette dernière peut présenter un ancrage lipidique dans la membrane, ce qui crée une quatrième boucle, I4

I. 1.3. Classification des RCPG

L'ensemble des RCPG constitue une superfamille, laquelle est structurée en sous-groupes ou familles. On en dénombre plusieurs classifications, établies sur la base de divers critères : séquence, mode de liaison du ligand, structure, phylogénie, composition en acides aminés... (Kumari *et al.*, 2009). Aujourd'hui, c'est la classification établie en 1994 par Kolakowski qui reste encore la plus souvent retenue. Celle-ci, basée sur la recherche de similarité entre RCPG connus de vertébrés ou d'invertébrés (Kolakowski, 1994), fixe sept classes : A, B, C, D, E, F, O.

Cette classification servira par la suite de base pour créer, dans les années 2000, la base de données des RCPG, appelée GPCRDB (Horn *et al.*, 2003). Une autre classification importante, proposée par Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin, répertorie les RCPG dans cinq classes sur la base de critères structuraux et du mode de liaison du ligand (Bockaert & Pin, 1999). Depuis, après le séquençage du génome humain, un nouveau système résultant de l'analyse phylogénétique des RCPG a été créé : le système GRAFS. Celui-ci classe les RCPG en cinq groupes distincts : G (Glutamate), R (Rhodopsine), A (Adhésion), F (Frizzled/Taste), et S (Sécrétine) (Schioth & Fredriksson, 2005).

Dans ce chapitre nous ne détaillerons que la classification de Kolakowski qui est celle la plus utilisée. Cette classification attribue une lettre à chaque famille de RCPG : A pour Rhodopsin-like, B pour Secretin-like, C pour Metabotrope-glutamate/pheromone, D pour fungal pheromone, E pour cyclic AMP, et enfin F pour Frizzled/smoothened.

La famille A est la mieux caractérisée et aussi celle qui comporte le plus grand nombre de récepteurs, avec plus de 80% des RCPG (Figure 3). Elle inclut la rhodopsine et le récepteur β 2-adrénérgique, et cette classe de récepteurs lie particulièrement des hormones, des polypeptides de petites et grandes tailles, des amines biogènes, des photons ou encore des substances apparentées aux lipides. La moitié des récepteurs de cette famille serait impliquée dans la reconnaissance de stimuli olfactifs, gustatifs ou de la lumière, et ont été surnommés récepteurs sensoriels. Cette classe est divisée en trois sous-groupes (Figure 4) : la sous-classe A.a comprenant des récepteurs de petites molécules, la sous-classe A.b comprenant des récepteurs des neuropeptides et la sous-classe A.c ou « LGR » (leucine rich repeats containing GPCR) comprenant des récepteurs d'hormones glycoprotéines. Structuellement, les RCPG

de cette famille présentent une extrémité N-terminale relativement courte. Ils possèdent aussi des séquences consensus, dont: le motif E/DRY à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire 3 (TM3), deux cystéines qui forment un pont disulfure sur les deux premières boucles intracellulaires (ICL1 et ICL2), et le motif NPXXY dans le domaine transmembranaire 7 (TM7) (Rovati *et al.*, 2007). On note également la présence d'un acide aspartique très conservé dans le TM2, dont le rôle serait la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G (Ceresa *et al.*, 1994). Une cystéine palmitoylée est retrouvée dans la partie C-terminale permettant la formation d'une quatrième boucle intracellulaire (ICL4) qui contient l'hélice 8.

Parmi ces séquences consensus, le motif E/DRY a fait l'objet d'une multitude d'études, notamment sur le rôle de ce motif dans l'activation des RCPG de la class A (Rovati, G. E *et al.* 2007). Des trois acides aminés qui composent ce motif, l'arginine est la mieux conservée avec 97% des RCPG de cette famille possédant une arginine ou une lysine ;vient ensuite l'asparagine, qui est conservée en tant qu'acide aminé acide (pouvant être substitué par un acide glutamique) dans 86% des récepteurs. Enfin, la tyrosine est la moins conservée (67%), et certaines études suggèrent que celle-ci n'est pas nécessaire pour la fonction du motif E/DRY (Flanagan, 2005 ; Figure 3).

Le site de liaison des récepteurs de cette famille est essentiellement formé par une cavité dessinée par les domaines transmembranaires où peut aller se glisser le ligand, à l'inverse des récepteurs des autres classes où l'extrémité N-terminale semble fortement impliquée (Rovati, *et al.*, 2007). Des exceptions ont cependant été remarquées, tels comme les récepteurs de la LH, FSH et TSH appartenant à la sous-classe A.c ou « LGR » (Schioth & Fredriksson, 2005).

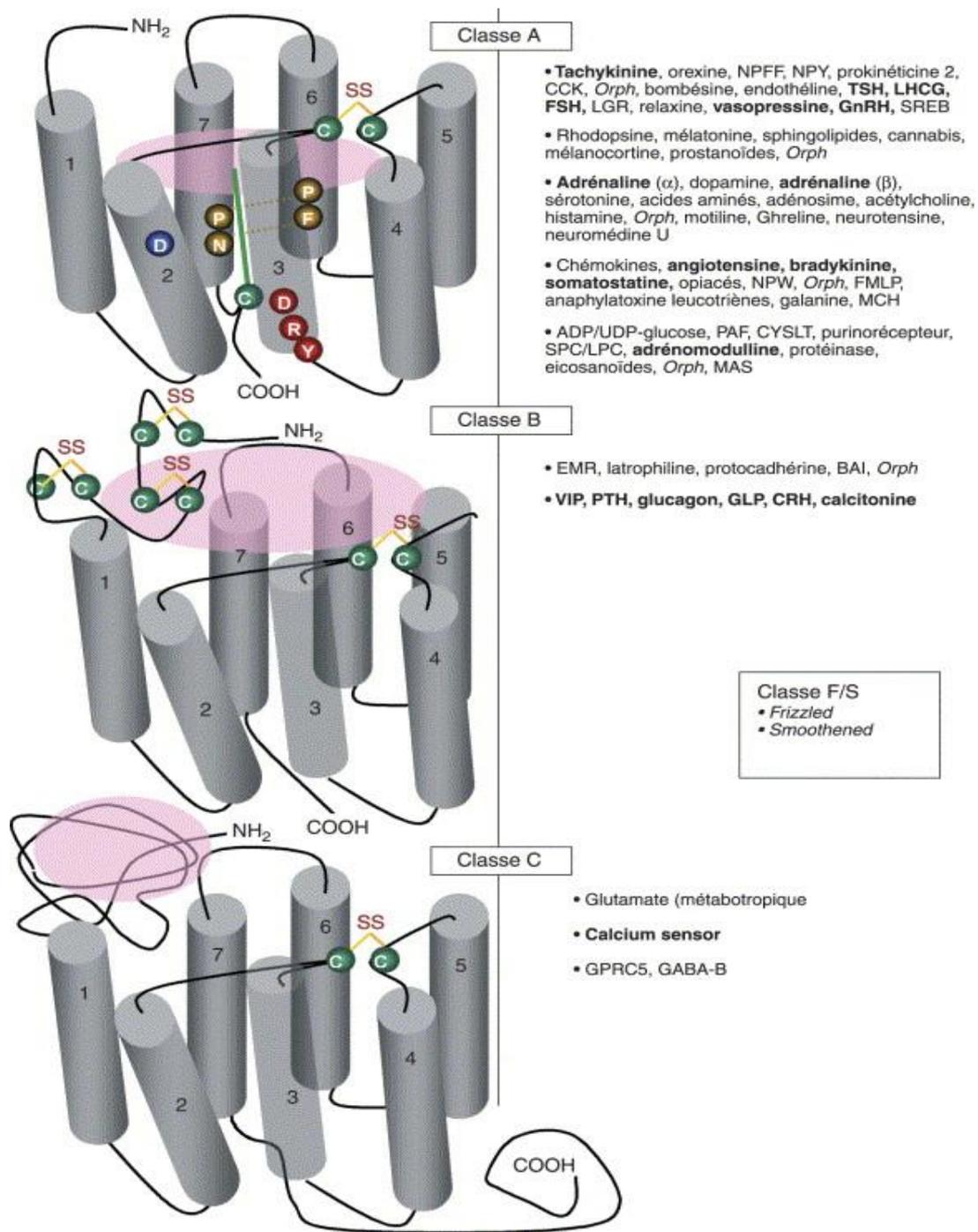


Figure 3: Les 3 principales familles de RCPG

La Famille B des RCPG ne présente qu'une faible homologie avec la Famille A, puisque les membres de ces classes partagent seulement 12% d'homologie de séquence. Cette famille regroupe des récepteurs structurellement proches du récepteur à la sécrétine (Figures 3 et 4). On y retrouve notamment le récepteur du glucagon, du GIP (gastric inhibitory polypeptide), du GLP-1R et GLP2-R (glucagon like peptide-1/2), le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTH), le récepteur à la calcitonin (CT), le récepteur à la GHRH (growth hormone releasing hormone) les récepteurs au VIP (vasoactive intestinal polypeptide) et du PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide).

Cette famille de RCPG se lie avec des peptides relativement grands tels que des hormones et neuropeptides présentant un pharmacophore diffus. Une des différences importantes avec la classe A est la taille de l'extrémité N-terminale, beaucoup plus longue chez la classe B, pouvant aller jusqu'à 300 acides aminés. Dans cette extrémité N-terminale se trouvent six acides aminés cystéines très conservés qui exercent des contraintes conformationnelles sur l'extrémité N-terminale du récepteur de par les ponts disulfures créés entre ces acides aminés. L'extrémité N-terminale confère aux récepteurs de la classe B, un mécanisme d'activation particulier et très différent de celui de la classe A. En effet, l'extrémité N-terminale apparaît comme très importante pour la liaison avec le ligand, ce qui permet à une autre partie du ligand, non impliquée dans l'interaction avec l'extrémité N-terminale du récepteur, d'interagir avec le cœur du récepteur entraînant l'activation de ce dernier (Miller *et al.*, 2007., Figure 4). Cependant, d'autres mécanismes d'activation des RCPG de classe B ont été proposés.

La Famille C des RCPG regroupe les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs au calcium, les récepteurs GABAB, les récepteurs du goût, les RAIG (retinoic acid-inducible orphan GPCR) et des récepteurs aux phéromones (Figures 3 et 4). Ces RCPG ont la particularité de présenter une extrémité N-terminale particulièrement longue d'environ 500 acides aminés. Le repliement de l'extrémité N-terminale donne lieu à la formation de deux lobes qui constituent le site de liaison de l'agoniste. Il existe, pour cette classe de RCPG, de nombreux ligands allostériques capables de moduler l'activité, des récepteurs en se liant à un site différent du site orthostérique. Certains acides aminés sont conservés dans la classe C et également au sein de la classe A, suggérant l'existence d'un ancêtre commun. Une autre particularité de la classe C réside dans la taille de la troisième boucle intracellulaire qui est très courte et très conservée. L'extrémité C-terminale forme la partie la moins conservée (Pin, *et al.*, 2003; Figures 3 et 4). D'un point de vue de l'activation des récepteurs de la famille C,

la dimérisation entre deux récepteurs identiques (hétérodimérisation) ou entre deux récepteurs différents (hétérodimérisation) est un élément crucial dans le processus d'activation. Le rôle de la dimérisation dans l'activation des récepteurs de cette famille a été particulièrement étudié et suggère qu'une seule molécule est suffisante pour activer un dimère de récepteur (Pin *et al.*, 2003).

Le clonage d'un certain nombre de gènes codant pour des récepteurs aux phéromones, exprimés dans des neurones de l'organe voméronasal (organe situé sous la surface intérieure du nez), et co-exprimés avec la protéine Go (récepteurs VR et GoVN), a conduit à intégrer ces protéines dans la classe C des RCPG (Pantages & Dulac, 2000).

La famille D. Cette famille est constituée de récepteurs aux phéromones principalement exprimés dans l'organe voméronasal, avec la protéine G de type Gi2. Les récepteurs aux phéromones comportent une soixantaine de gènes chez les insectes (Nakagawa *et al.*, 2005). Elle inclut également des récepteurs de phéromones de levures, tels que les récepteurs des facteurs *ste2* et *ste3* (Josefsson, 1999).

La Famille E. Cette famille est formée par les quatre récepteurs à l'AMPc (cAR 1–4), et d'autres récepteurs « cAMP receptor-like » caractérisés chez *Dictyostelium discoideum* (moisissures). A ce jour, aucun homologue n'a été trouvé chez les vertébrés ce qui en fait une famille minoritaire, mais unique, de RCPG. Ces récepteurs sont exprimés par *Dictyostelium discoideum* lors des étapes précoces de son développement où ils participent au système de signal chimiotactique. Plus tard dans le développement, ils interviennent dans la différenciation cellulaire et dans le contrôle du cycle cellulaire (Prabhu & Eichinger, 2006).

La Famille F. Cette famille de récepteurs rassemble des récepteurs homologues aux protéines « frizzled » et « smoothed ». Les récepteurs de type « frizzled » jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et plus particulièrement dans le contrôle de la prolifération et la polarité cellulaire, en se liant avec Wnt et en activant le signal Hedgehog. Ils sont également impliqués dans les processus de différenciation cellulaire et d'apoptose (Wang *et al.*, 2006). Chez les mammifères, dix récepteurs “frizzled” et un récepteur smoothed sont identifiés. Leurs boucles intracellulaires sont parmi les plus courtes des RCPG, et la longueur de la partie C-terminale varie d'une vingtaine à plus de 200 acides aminés chez l'homme. Ces récepteurs présentent une homologie de séquence faible mais significative avec la famille B (Malbon, 2004).

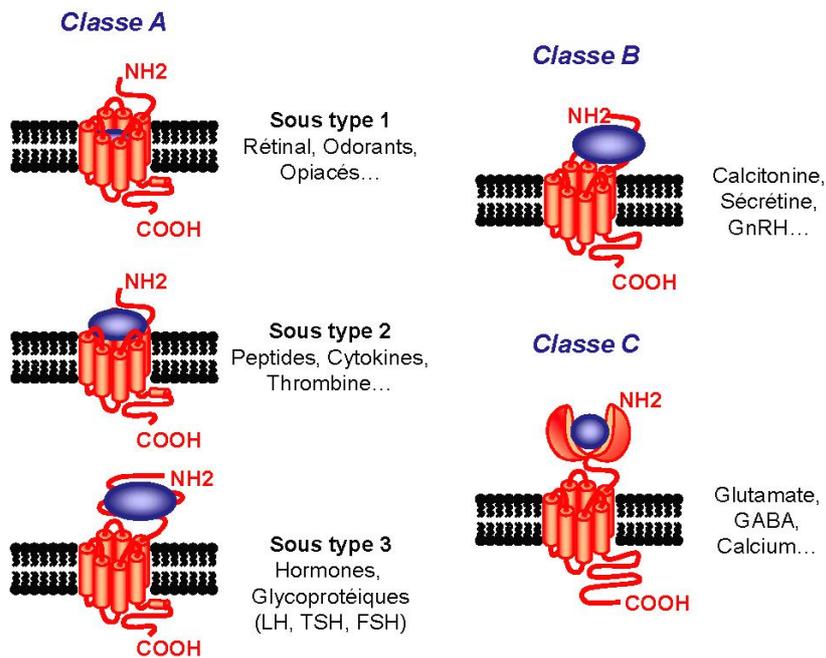


Figure 4: Les différentes classes de RCPG

I. 1.4. Les protéines G hétérotrimériques

Toutes les protéines G se présentent sous une forme hétérotrimérique. Elles sont constituées de sous-unités: une sous-unité α et les sous-unités $\beta\gamma$, qui se présentent sous forme d'hétérodimère. Après fixation d'un ligand agoniste sur le récepteur, leur activation leur permettra de s'activer et d'interagir avec leurs effecteurs spécifiques et, ainsi, de générer la cascade de signalisation.

La complexité et la spécificité de réponse dépendent en partie de la diversité des sous-unités des protéines G. De nombreuses sous-unités ont été clonées, dont 28 sous-unités α (produits de 16 gènes et des variants d'épissage), 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ , et de masse moléculaire d'environ 39-45, 35-39 et 6-8 kDa respectivement. Les sous-unités α sont réparties en 4 groupes : Gs, Gi/o, Gq, et G12/13 (Kristiansen, 2004).

D'après leur séquence, les protéines G sont des protéines solubles. Cependant, elles présentent des modifications post-traductionnelles leur permettant d'avoir un ancrage à la membrane, optimisant leur interaction avec les RCPG et leurs effecteurs du fait des rencontres dans un espace bidimensionnel. Ainsi, les sous-unités α sont myristoylées (C14:0) sur un

résidu glycine situé à l'extrémité N-terminale. Les sous-unités α sont également palmitoylées (C16:0) sur un résidu cystéine. Certaines sous-unités sont palmitoylées une seule fois (G α 8 et G α 12), tandis que d'autres le sont deux fois (G α 9 et G α 13; Chen, C.A & Manning, D.R. 2001). Les sous-unités γ sont également modifiées au niveau de l'extrémité carboxy-terminale par la fixation de groupements poly-isoprénoïdes (farnésyl ou géranyl-géranyl) sur un résidu cystéyl (Figure 5). Les sous-unités β ne présentent quant à elles aucune modification post-traductionnelle (Milligan & Kostenis, 2006).

Les structures tridimensionnelles de plusieurs protéines G ont été déterminées en présence de GDP ou de GTP; des différences structurales entre ces conformations sont alors apparues (Sprang, 1997; Oldham & Hamm, 2008). Si l'on observe la sous-unité α , on constate qu'elle possède structurellement d'une part un domaine GTPasique impliqué dans la liaison et l'hydrolyse du GTP, et d'autre part un domaine en hélice qui permet de maintenir le GTP dans le cœur de la protéine. L'observation de la sous-unité β permet de constater qu'elle est, quant à elle, constituée de 7 feuillets β , et que son extrémité N-terminale est structurée en hélice α et forme un domaine « coiled-coil » avec l'extrémité N-terminale de la sous-unité γ (Figure 6). La résolution de structures tridimensionnelles d'hétérotrimères de protéines G a permis l'identification de sites d'interaction entre la sous-unité α et le dimère $\beta\gamma$, qui sont, dans le cas de la sous-unité α , l'extrémité N-terminale et la boucle II comme le montre pour exemple la (Figure 6) représentant la rhodopsine et sa protéine G associée (Walleet *al.*, 1995; Lambright, *et al.*, 1996).

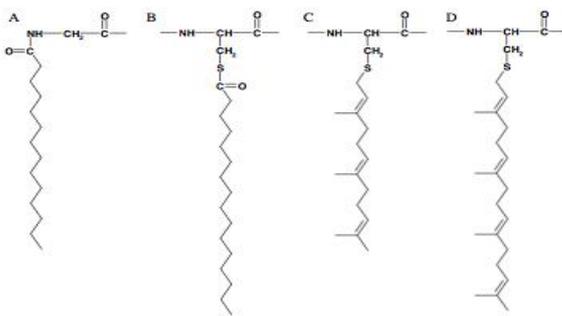


Figure 5 : Modifications post-traductionnelles des protéines G.

Les différentes acylations portées par les protéines G, avec les acides aminés sur lesquels elles sont liées sont représentées.

A/ N-myristoylglycine;

B/ S-palmitoylcystéine;

C/ S-farnésylcystéine

D/ S-géranylgéranylcystéine.

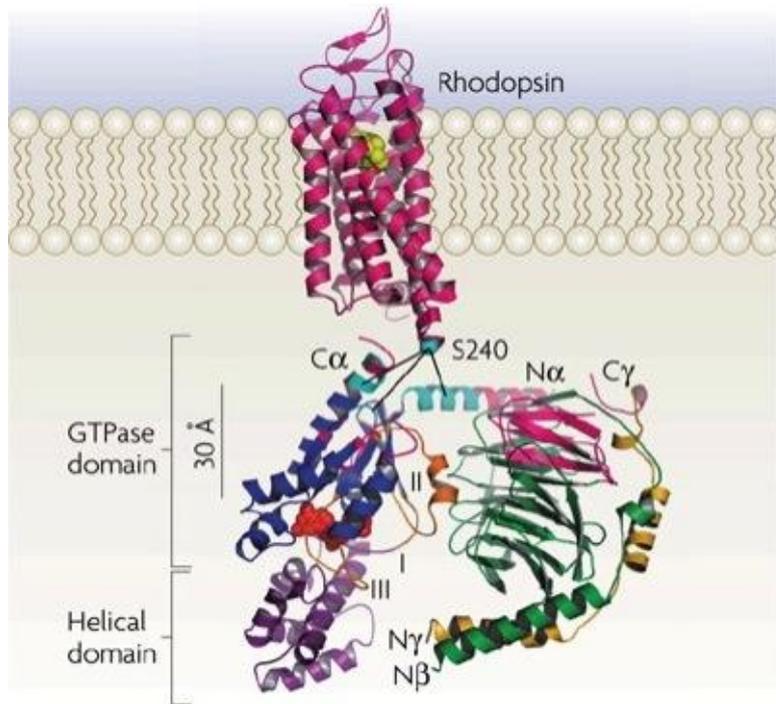


Figure 6 : Structure tridimensionnelle schématique de la rhodopsine et de sa protéine G associée, la transducine.

La sous-unité α comprend un domaine en hélice (violet) et un domaine GTPasique (bleu foncé) contenant 3 boucles flexibles (I, II et III) et liant une molécule de GDP (rouge). Les sous-unités β et γ sont représentées en vert et en jaune respectivement. Les sites de contacts entre la protéine G et le récepteur sont indiqués en rose et en bleu ciel. Les modifications post-traductionnelles de la transducine ne sont pas représentées (Oldham & Hamm, 2008).

Le recours à d'autres techniques biophysiques ou biochimiques a permis d'observer l'existence de sites de contact entre récepteur et protéine G. Ainsi par exemple, grâce à des études de spectroscopie de fluorescence, on a pu mettre en évidence l'interaction de l'extrémité C-terminale de la sous-unité α avec l'hélice transmembranaire 6 de la rhodopsine (Janz&Farrens, 2004). D'autres approches, telles que des expériences de mutagenèse ou de pontage chimique, ont également permis d'identifier, entre autres, une interaction entre le récepteur et l'hélice N-terminale de la sous-unité α (Onrust *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2001). Ces études ont permis de proposer une zone d'interaction entre le récepteur et la protéine G hétérotrimérique. Cependant, ces observations, cumulées à la comparaison des tailles du récepteur et de l'hétérotrimère, tendent à montrer que l'empreinte membranaire d'une

protéine G hétérotrimérique est bien plus grande que celle d'un récepteur. Dans ce contexte, ces données iraient donc en faveur d'un mécanisme de dimérisation des RCPG lors de l'activation des protéines G, ou bien d'un mécanisme d'interactions séquentielles entre différentes régions de la protéine G et le récepteur (Baneres & Parello, 2003; Herrmann *et al.*, 2004).

Cycle d'activation – inactivation des protéines G

A l'état inactif, les 3 sous-unités α et $\beta\gamma$ sont associées, la sous-unité α étant liée à une molécule de GDP. La vision communément admise postule que l'activation du récepteur par l'agoniste va entraîner un changement conformationnel du récepteur qui va impliquer une affinité supérieure pour une protéine G hétérotrimérique particulière et favoriser leur association. Cette interaction engendre une modification de la conformation de la sous-unité α induisant une diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le GDP, favorisant alors la fixation d'une molécule de GTP à la place du GDP. Cet échange va permettre l'activation des protéines G et entraîner la dissociation du complexe hétérotrimérique en une sous-unité α et un dimère $\beta\gamma$ (Neer, 1995). La sous-unité α liée au GTP mais également le dimère $\beta\gamma$ vont pouvoir interagir avec les effecteurs appropriés. Puis le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α , permettant la reformation du complexe $\alpha\beta\gamma$ inactif (Figure 7; Milligan & Kostenis, 2006).

Toutefois, ce modèle classique à trois partenaires (RCPG, protéines G et effecteurs) laisse maintenant place à un modèle à quatre partenaires (Figure 7). En effet, l'hydrolyse spontanée du GTP, au sein des $G\alpha$ -GTP purifiées, est trop lente pour rendre compte des vitesses de désactivation de leurs effecteurs. Un quatrième partenaire au système a ainsi été identifié : il s'agit des protéines RGS (pour « Regulator of G-protein Signaling »). Ces protéines accélèrent de 50 à 100 fois l'hydrolyse du GTP des sous-unités $G\alpha$ et comprennent plus de 30 membres (Dohlman & Thorner, 1997).

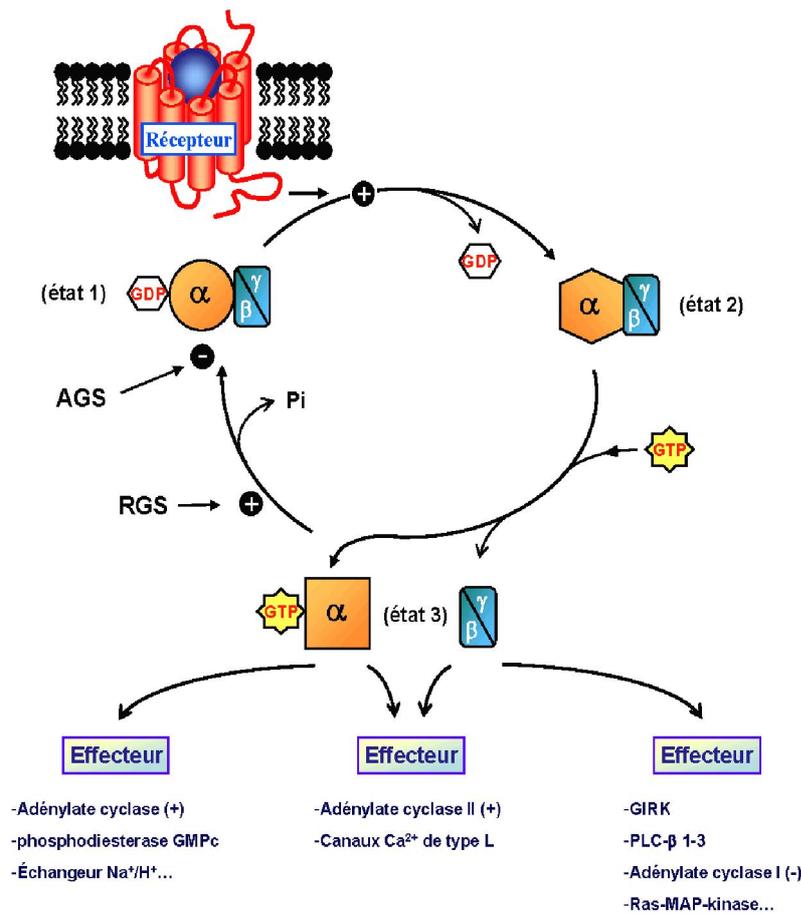


Figure 7 :Cycle d'activation – inactivation des protéines G

La protéine-G hétérotrimérique, associée au GDP, est inactive dans l'état 1. Le récepteur activé stimule la libération du GDP. L'état 2, très transitoire, est caractérisé par l'absence de nucléotide au sein de la sous-unité α . L'association du GTP au site nucléotidique entraîne la dissociation entre les différents partenaires pour agir sur leurs effecteurs appropriés (état 3). Les protéines RGS interviennent dans le cycle d'inactivation des protéines G en accélérant la vitesse d'hydrolyse du GTP (Bockaert & Pin, 1998)

I.1.4.1. Les différents états d'activation des RCPG

C'est dès la fin du 19^e siècle que l'on a vu émerger le concept de récepteur, sur la base, notamment, des travaux de John Newport Langley et Paul Ehrlich. Et dans les années 1930 Clark propose, sur la base de la loi d'action de masse, la première modélisation mathématique, ce qui l'amènera à conclure qu'en termes de pharmacologie, l'effet généré par une drogue est directement proportionnel au nombre de récepteurs occupés (Clark, 1933). De nouveaux concepts ont émergé depuis, de par l'évolution des techniques d'études des

récepteurs, notamment des RCPG. En effet, De Lean et ses collaborateurs ont travaillé sur le récepteur β -adrénergique exprimé dans les érythrocytes de grenouille. Ils ont montré que sous l'effet d'un ligand agoniste, il existait deux populations du récepteur : l'une ayant une haute affinité et l'autre ayant une faible affinité pour l'agoniste. Ces données leur ont permis d'énoncer le modèle ternaire (Figure 8A), dont les acteurs sont le ligand (L), le récepteur (R) et une molécule X, qui a été identifiée plus tard comme étant la protéine G (De Lean *et al.*, 1980).

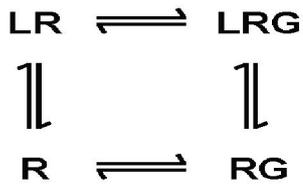
Les récepteurs peuvent avoir une activité constitutive ; en effet, des récepteurs peuvent, en l'absence de ligand agoniste, déclencher spontanément une réponse physiologique : c'est ce qu'a permis de découvrir la surexpression des récepteurs. Cependant, certains ligands peuvent venir abolir cette activité constitutive, ce qui amène à la notion d'agoniste inverse. Il convient d'observer ici que la majorité des ligands décrits comme des antagonistes avant même la découverte de l'activité constitutive des récepteurs seraient des agonistes inverses, ce qui tendrait à montrer que ce phénomène est largement étendu. Cette activité constitutive peut aussi apparaître par l'introduction de mutations, comme en témoignent les travaux de Samama et son équipe sur le récepteur β_2 -adrénergique (Lefkowitz *et al.*, 1993; Samama *et al.*, 1993). Le modèle ternaire admis jusqu'alors ne peut rendre compte de cette activité constitutive, ce qui a conduit à proposer le modèle ternaire étendu (Figure 8B). Le récepteur existerait sous deux formes conformationnelles différentes, en équilibre, la forme R* représentant le récepteur dans un état de haute affinité pour le ligand agoniste. L'antagoniste quant à lui est capable de se fixer avec la même affinité sur les formes R et R*. La fixation d'un agoniste va engendrer un changement de conformation du récepteur (déplacement de la forme LR vers la forme LR*) ou bien stabiliser le récepteur R* qui peut être lié ou non à la protéine G, les deux voies aboutissant à la formation d'un complexe ternaire LR*G (Lefkowitz *et al.*, 1993; Samama *et al.*, 1993). Cependant, même si ce modèle peut s'appliquer à beaucoup de récepteurs, il ne peut expliquer quelques récentes observations qui montrent l'existence d'un complexe ternaire LRG n'induisant pas de réponse cellulaire, d'où la proposition du modèle ternaire cubique représenté sur la Figure 8C (Weiss *et al.*, 1996; Kenakin, 2004).

Si l'efficacité d'un ligand donné peut être déterminée grâce aux trois modèles décrits ci-dessus, ceux-ci, en revanche, ne rendent compte que d'un nombre limité de conformations. C'est par une approche totalement différente qu'il a été proposé de décrire, par un modèle dit probabiliste, le comportement des récepteurs (Onaran&Costa1997). Selon ce modèle, un récepteur (non lié à un ligand) présente une multitude d'états dans un espace conformationnel

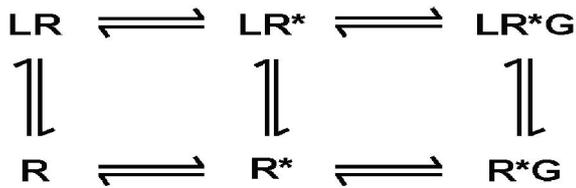
donné. La distribution des fréquences de ces différents états conformationnels va être modulée par la liaison du ligand et/ou des protéines G. Ainsi, les différents comportements des RCPG, tels que leur oligomérisation, peuvent être pris en compte par ce modèle probabiliste (Bouvier, 2001; Kenakin, 2004).

La découverte d'autres protéines d'interaction, mais aussi les possibilités de dimérisation des récepteurs, de précouplage des divers partenaires ainsi que les processus de régulation pouvant intervenir soulignent la complexité de ce système (Gudermann *et al.*, 1996). Dans ce dernier cas en effet, diverses études menées sur l'association entre les protéines G et les récepteurs font actuellement débat. Certains auteurs proposent un modèle de « rapid collision coupling » (Hein *et al.*, 2005), tandis que d'autres proposent plutôt un précouplage protéine G/récepteur (Neubig, 1994; Gales *et al.*, 2006).

A. Modèle ternaire



B. Modèle ternaire étendu



C. Modèle ternaire cubique

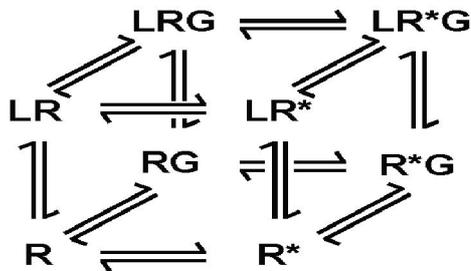


Figure 8 : Les différents modèles d'activation des RCPG(Neer, 1995).

Le récepteur existe dans deux états conformationnels : un état de haute affinité pour l'agoniste (R*) et un état de basse affinité pour l'agoniste (R). Il peut se lier au ligand (L) et/ou à la protéine G (G).

A/ Modèle ternaire

B/ Modèle ternaire étendu

C/ Modèle ternaire cubique

I.1.4.2. Transduction du signal des RCPG

Les effecteurs sont le troisième partenaire impliqué dans la transduction du signal associée aux RCPG. Les protéines G sont capables de moduler l'activité des effecteurs à la fois par les sous-unités α liées au GTP, mais également via les dimères $\beta\gamma$ (Clapham & Neer, 1993). Ces effecteurs activés vont pouvoir induire la réponse appropriée et peuvent être des enzymes ou des canaux ioniques(Figure 9). Les deux principales voies de transduction du

signal via les RCPG, l'adénylate cyclase et la phospholipase C- β vont être décrites dans ce qui suit.

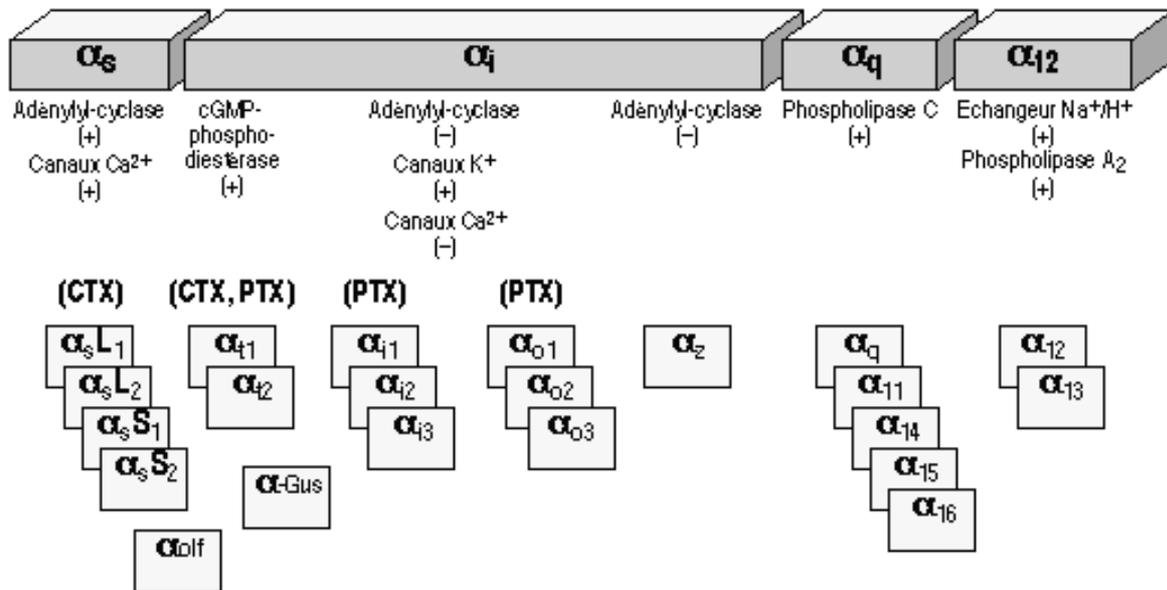


Figure 9: Protéines G hétérotrimériques et leurs effecteurs (Hermans, 2003).

La Figure montre les effecteurs spécifiques des différentes sous-unités des protéines G ainsi que le type de modulation associée (inhibition ou activation).

I.1.4.2.a. La famille des adénylates cyclases

La famille des adénylates cyclases est composée de 10 membres chez les mammifères: 9 protéines membranaires et 1 protéine soluble (Hanoune&Defer, 2001; Tesmer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1996). La plupart de ces isoformes qui pourtant ne sont pas des variants d'épissage dans la mesure où elles sont portées par des gènes distribués sur des chromosomes différents (I=c7 ; II=c5 ; III=c2 ; IV=c14 ; V=c3 ; VI=c12 ; VII=c10 ; VIII=c8 ; IX=c16 ; X=c1), sont stimulées par la famille des protéines *Gas* et inhibées par la famille des protéines *Gai* (Hanoune &Defer, 2001). Les 9 adénylate cyclases membranaires ont une structure similaire comprenant 2 domaines de 6 segments transmembranaires (M1 et M2) et deux domaines cytoplasmiques C1 et C2 correspondant respectivement à la boucle cytoplasmique séparant les 2 domaines transmembranaires et à l'extrémité C-terminale (Figure 10). Ces deux

domaines C1 et C2 sont subdivisés en deux régions différentes a et b (C1a/b et C2a/b), la partie catalytique de l'adénylate cyclase étant constituée par la zone d'interface des domaines C1a et C2a (Tesmer *et al.*, 1997). Ce site actif catalyse donc l'attaque du groupement hydroxyle en 3' du ribose de l'adénosine triphosphate (ATP) et permet la formation de l'AMPc. L'activation de l'adénylate cyclase induit donc une augmentation de la concentration en AMPc dans le cytoplasme. L'AMPc peut ainsi activer laprotéine kinase A qui permet la phosphorylation de nombreuses protéines et donc de moduler leur fonction. Ainsi, l'AMPc aura en particulier un effet cytosolique ou membranaire par l'intermédiaire de la phosphorylation de canaux ioniques, de récepteurs membranaires ou de protéines cytoplasmiques ; et un effet nucléaire par l'intermédiaire de la phosphorylation dans le noyau de la protéine CREB qui permettra l'activation ou la répression de la transcription de différents gènes.

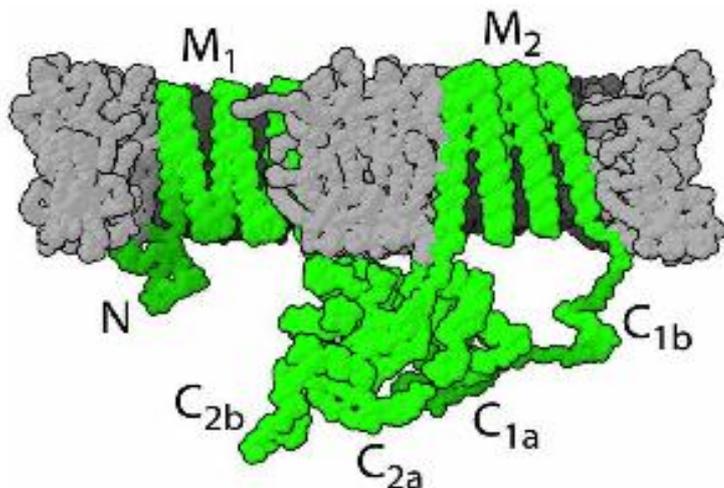


Figure 10 :Structure de l'adénylate cyclase de type II.

I.1.4.2.b. stimulation de la phospholipase

De nombreux RCPG sont activés par la famille des protéines Gq (incluant les protéines G α 11, G α 14, G α 15 et G α 16), qui est responsable de la stimulation de la phospholipase C- β (PLC- β). La PLC- β est une enzyme liée à la face intracellulaire de la membrane. Elle catalyse le clivage du PIP2 en IP3 et DAG. Ces deux molécules sont des messagers secondaires et vont entraîner des effets distincts. L'IP3 provoque une augmentation de la concentration du calcium dans le cytoplasme en agissant sur les canaux calciques du

réticulum endoplasmique, tandis que le DAG active la protéine kinase C qui elle-même va permettre l'ouverture des canaux calciques de type L présents au niveau de la membrane plasmique. La libération de calcium intracellulaire pourra, quant à elle, conduire à la modulation de nombreux processus. En particulier, les ions Ca^{++} en se liant à la calmoduline activeront des protéines kinases calmoduline-dépendantes qui pourront agir sur d'autres protéines effectrices (Exton *et al.*, 1996).

I.1.4.2.c. Canaux

Certains canaux ioniques sélectifs au sodium, au calcium ou au chlore sont activés par la sous-unité α_s et inhibés par les sous-unités α_i et α_o alors que les canaux potassiques KM et KACh sont activés par les sous-unités α_i et α_o . Les sous-unités $\beta\gamma$ activent certains canaux potassiques à rectification entrante (KACh et Kir3.0) et inactivent certains canaux calciques dépendants du voltage (CaV2.1 et CaV2.2) que l'on trouve dans le coeur et le cerveau. L'activation ou l'inhibition de ces différents canaux peut conduire à une modification du potentiel de membrane des cellules et dans le cas des neurones s'opposer ou faciliter la naissance des potentiels d'action. Par ailleurs, la modulation de l'activité des canaux calciques voltages dépendants conduit directement à une activation ou une inhibition de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Luttrell *et al.*, 1997).

I.1.4.2.d. Autres effecteurs

D'autres types de phospholipases telles que les phospholipases D et A2 peuvent également être activées par les protéines G. La GMP cyclase est également un effecteur des protéines G ainsi que certaines tyrosines kinases (Cabrera-Vera *et al.*, 2003).

I.1.5. Autres protéines interagissant avec les RCPG

Au cours de ces 20 dernières années de très nombreuses protéines capables d'interagir avec les RCPG ont été identifiés (Magalhaes *et al.*, 2012). Elles sont impliquées principalement dans la modulation de l'activité des récepteurs ainsi que leur trafic intracellulaire et leur localisation dans des microdomaines membranaires. Elles peuvent être

cytoplasmiques ou membranaires. Dans ce paragraphe, je ne décrirai que les deux types de partenaires qui interagissent avec la grande majorité des RCPG : les GRK ou kinases associés aux RCPG ainsi que les β -arrestines

I.1.5.a. Les GRK et la désensibilisation du signal induit par les RCPG

Dans le domaine de la biologie des RCPG, l'identification de la première protéine kinase indépendante des seconds messagers, capable de phosphoryler un RCPG activé par son agoniste et de désensibiliser la réponse induite par celui-ci, a constitué une véritable révolution. En raison de sa capacité à phosphoryler le récepteur β 2adrénergique activé, cette kinase a, initialement, été nommée β -ARK (β -Adrenergic Receptor Kinase) (Benovic *et al.*, 1986). La découverte d'autres protéines kinases similaires, a permis de les réunir en famille, appelée famille GRK (G protein-coupled receptor kinase), la β -ARK étant renommée GRK2. Cette famille est en fait constituée de sept GRK différentes, qui ont été reclassées en trois sous-groupes selon leur distribution tissulaire et leur sélectivité pour certains RCPG. Ces sous-groupes sont divisés de la manière suivante : (1) GRK1 et GRK7, respectivement les GRK de la rhodopsine et du récepteur « cone-opsin », (2) GRK2 et GRK3 exprimés de manière ubiquitaire, (3) GRK4 exprimée dans le cerveau, les reins et majoritairement dans les testicules, GRK5 et GRK6 exprimées de manière ubiquitaire. Ainsi, la majorité des RCPG sont plutôt régulés par GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6.

Les GRK phosphorylent des sérines et thréonines localisées dans les domaines intracellulaires des RCPG, notamment au niveau de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale. Le site de phosphorylation peut varier selon le RCPG. Par exemple, les récepteurs α 2-adrénergique et muscarinique M2 ont une extrémité C-terminale relativement courte avec peu de sérine/thréonine, alors que leur troisième boucle intracellulaire en présente un nombre important. A l'inverse, la rhodopsine et le récepteur β 2-adrénergique présentent une troisième boucle intracellulaire relativement courte avec peu de motifs sérine/thréonine alors que leur extrémité C-terminale est plus longue et riche en sérines/thréonines. La mutation de toutes les sérines/thréonines en alanine de l'extrémité C-terminale du récepteur β 2-adrénergique ou de la troisième boucle intracellulaire du récepteur muscarinique M2 abolit complètement la phosphorylation de ces récepteurs par les GRK (Bouvier *et al.*, 1988; Nakata *et al.*, 1994).

Selon une étude, la phosphorylation par les GRK ne serait pas suffisante pour produire

une désensibilisation de la réponse d'un récepteur : cette constatation tend à faire penser qu'une protéine tiers intervient dans le processus de désensibilisation (Pitcher *et al.*, 1992). Or quelques années plus tôt déjà, une nouvelle famille de protéines régulatrices avait été découverte : les arrestines, capables de se lier, avec une haute affinité, au RCPG phosphorylés par les GRK (Lohse *et al.*, 1990). Les β -arrestines sont des protéines régulatrices capables de découpler les protéines G des RCPG phosphorylés, mais qui, de surcroît, jouent un rôle essentiel dans le processus d'internalisation des RCPG et leur trafic intracellulaire. Les caractéristiques détaillées des β -arrestines et leurs multiples rôles cellulaires seront abordés dans la partie suivante (mécanismes d'internalisation des RCPG dépendants des β -arrestines).

Un modèle de référence de la désensibilisation potentiellement applicable à tous les RCPG a été établi (Figure 11). Dans ce modèle, les sérines et thréonines de la troisième boucle intracellulaires ou de l'extrémité C-terminale du RCPG activé sont les substrats des GRK qui phosphorylent ces acides aminés. La phosphorylation de ces motifs sur les RCPG, augmente l'affinité des régions phosphorylées pour les β -arrestines, qui se lient au RCPG et provoquent le découplage par gêne stérique de la protéine G du récepteur, entraînant ainsi la désensibilisation de la réponse (Krupnick & Benovic, 1998). Dans ce modèle, l'occupation du récepteur par un agoniste est cruciale. En effet une étude a montré, en utilisant la technique de F.R.E.T, que le retrait du ligand provoque la dissociation rapide du complexe récepteur β 2-adrénergique- β - arrestine (Krasel *et al.*, 2005)

I.1.5.b. Les mécanismes d'internalisation des RCPG dépendants des β -arrestines

Le processus d'endocytose où s'engage le récepteur intervient après l'étape de désensibilisation par les GRK, la liaison des β -arrestines au récepteur permettant le découplage de la protéine G. Les arrestines recrutent ensuite, en effet, un ensemble de partenaires, parmi lesquels la clathrine et l'adaptateur AP-2 ; et elles rassemblent les récepteurs au sein de puits recouverts de clathrine. La clathrine est une protéine de structure en forme de triskèle dont les branches s'assemblent pour former une structure polyédrale, constituant ainsi un manteau recouvrant certaines vésicules de la cellule. Ces puits recouverts de clathrine vont s'invaginer vers l'intérieur de la cellule, et une petite GTPase, la dynamine, va venir assurer la fusion des membranes pour créer une vésicule d'endocytose contenant les récepteurs toujours attachés à la membrane. C'est la dynamine qui assure la scission de la vésicule d'endocytose de la membrane. Cette vésicule nouvellement formée rejoindra le

réseau vésiculaire grâce au cytosquelette de la cellule, où son contenu sera trié (Figure 11 ; Volovyk *et al.*, 2006; Wolfe & Trejo, 2007).

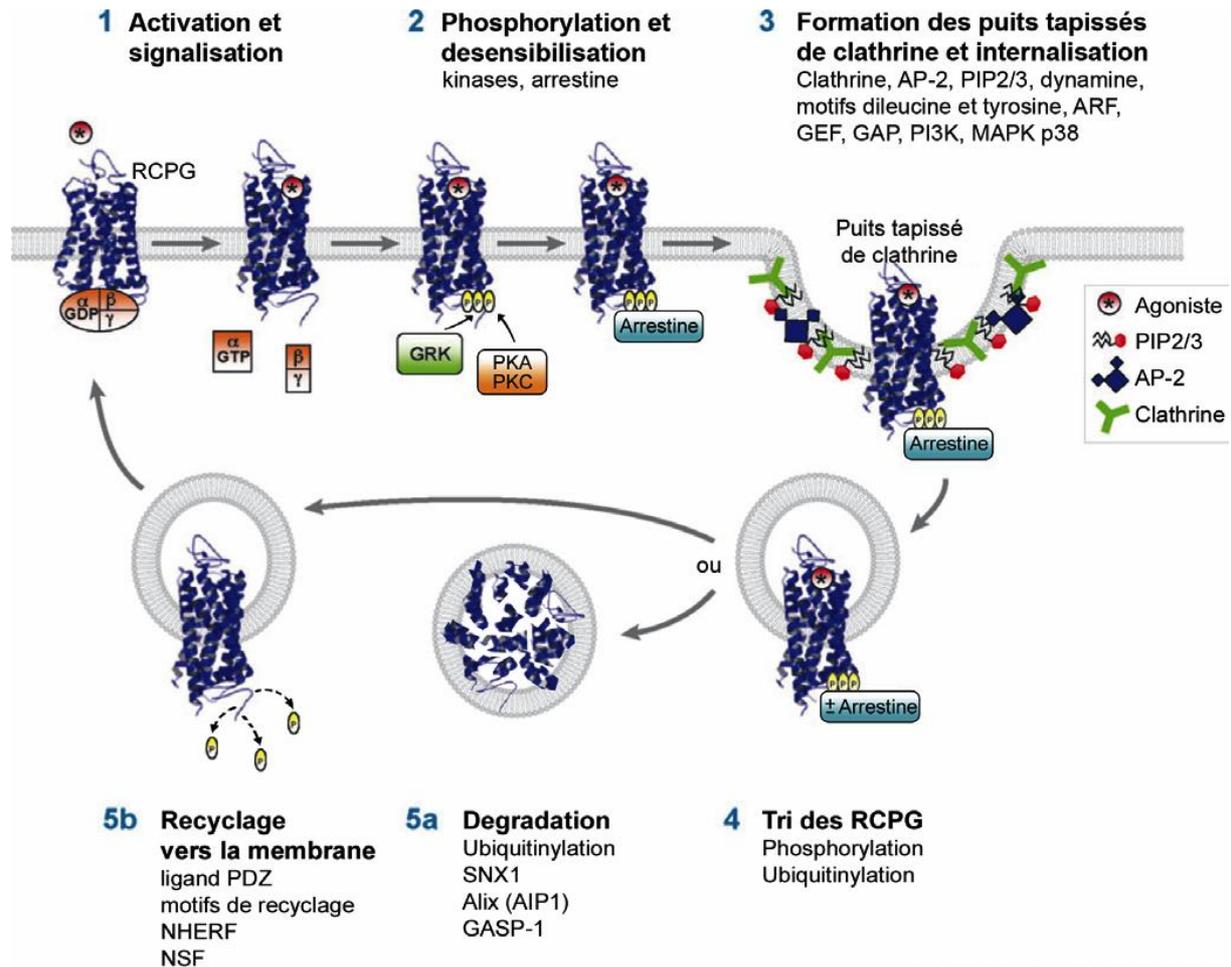


Figure 11. schématique des étapes majeures de l'adaptation à la stimulation des RCPG.

l'agoniste sur le récepteur active la transduction du signal via la protéine G (1). La signalisation du récepteur est arrêtée par la phosphorylation de ses domaines intracellulaires par les GRK (désensibilisation homologue) ou les PKA/PKC (désensibilisation hétérologue) et le recrutement de la β -arrestine (2). Les récepteurs désensibilisés sont internalisés via la voie des vésicules tapissées de clathrine (3). Les vésicules d'endocytose rejoignent l'endosome précoce puis l'endosome de tri. À ce stade là, la β -arrestine peut encore être associée au récepteur dans certains cas (4). Le récepteur est alors dégradé au niveau du compartiment lysosomal ou du protéasome (5a) ou recyclé vers la membrane cytoplasmique (5b), son domaine carboxyl-terminal étant alors déphosphorylé et l'agoniste dissocié.

On dénombre à ce jour 4 arrestines dont 2 (les arrestines 1 et 4) sont exclusivement exprimés dans la rétine et la glande pinéale (Smith *et al.*, 1994; Graft *et al.*, 1994). et 2 sont exprimés dans tous les types cellulaires (arrestines 2 et 3). Les arrestines se lient préférentiellement aux récepteurs activés par un ligand et phosphorylés par les GRK (Lohse *et*

al., 1990 ; Lohse *et al.*, 1992). Plus récemment, un rôle important des arrestines dans différentes voies de signalisation a été décrit et notamment en tant qu'adaptateur de différentes cascades de signalisation (Lefkowitz & Shenoy, 2004).

I.2. La protéine GASP-1

Parmi les nombreuses protéines interagissant avec les RCPG seule GASP-1, à l'instar des GRK et des arrestines, semble interagir avec un très grand nombre de récepteurs différents. Dans cette partie j'aborde les différents aspects concernant cette protéine et les autres membres de cette famille

La protéine GASP-1 a été identifiée pour sa capacité à interagir avec le domaine carboxyl-terminal de plusieurs RCPG. Il a été montré que la protéine GASP-1 (*GPCR associated sorting protein 1*) dirige les récepteurs DOR (Whistler *et al.*, 2002), D2 (Bartlett *et al.*, 2005) et CB1 (Martini *et al.*, 2007; Tappe-Theodor *et al.*, 2007) vers le compartiment lysosomal où ils sont dégradés. Ainsi, la surexpression d'un mutant dominant négatif de GASP-1 permet d'inhiber la dégradation de ces récepteurs et de favoriser leur retour à la membrane plasmique. L'inhibition de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur D2 à l'aide d'anticorps dirigés contre GASP-1 produit une resensibilisation partielle des neurones de l'aire tegmentale ventrale du cerveau de rat (Bartlett *et al.*, 2005).

Parallèlement, l'équipe de Tohru Matsuki (Matsuki *et al.*, 2001) a identifié GASP-1 comme partenaire d'interaction de Per1, une protéine impliquée dans le mécanisme du rythme circadien. En utilisant la technique du double hybride dans la levure avec le domaine PAS de la protéine Per1 comme appât, ils identifient trois partenaires d'interaction de Per1. Parmi eux, une protéine de 1374 acides aminés (chez le rat) qu'ils nomment PIPS (Per1 interacting protein of the suprachiasmatic nucleus), localisée dans les noyaux suprachiasmatic et supraoptique, le cortex, l'hippocampe et le cervelet. Il a été ensuite établi que PIPS est la même protéine que GASP-1.

I.2.1. Identification de GASP

Les premières études sur GASP ont été réalisées sur les récepteurs aux opioïdes par le Dr Whistler et ses collaborateurs (Whistler *et al.*, 2002), qui ont été les premiers à établir le lien

entre GASP-1 et l'internalisation des récepteurs DOR (Delta Opioid Receptor), Des recherches précédentes suggéraient que l'endocytose avait des conséquences différentes sur MOR (Mu Opioid Receptor) par rapport à DOR. En effet, DOR subit une régulation négative importante après 2 heures de stimulation avec un agoniste, tandis que le niveau d'expression de MOR n'est pas affecté. De plus, en microscopie à fluorescence on observe une colocalisation de DOR et du marqueur lysosomal LAMP, ce qui n'est pas le cas de MOR. Suivant l'hypothèse que la partie cytoplasmique de DOR se lie à une molécule qui entraînerait DOR vers une dégradation par les lysosomes, l'équipe de Whistler répète l'expérience avec des mutants : la partie C-terminal de DOR est remplacé par la partie C-terminal de MOR (= M DOR) et inversement (= D MOR). Ils observent que D MOR est protéolysé après endocytose alors que M DOR ne l'est pas : DOR contiendrait un signal non conservé dans MOR. Ce signal serait fonctionnellement impliqué dans le devenir post-endocytique menant à la dégradation.

Ensuite, un criblage par la méthode du double hybride d'une librairie d'ADNc dérivée de la lignée cellulaire HEK293 a permis d'identifier une protéine interagissant avec la partie C-terminal de DOR. Cette protéine a été appelée GASP pour GTP-binding protein (G protein)-coupled receptor-associated sorting protein.

I.2.2. Description de la famille GASP

La protéine GASP-1 a été identifiée de manière concomitante au sein de notre laboratoire et par l'équipe de J. Whistler dans des essais de criblage par double hybride chez la levure visant à identifier de nouveaux partenaires d'interaction du récepteur DOR (Abu-Helo & Simonin, 2010; Simonin *et al.*, 2004 ; Whistler *et al.*, 2002., Figure 12).

Par la suite, des recherches d'homologie de séquence ont montré chez GASP-1 la présence d'un domaine carboxyl-terminal de 250 acides aminés possédant une forte identité de séquence avec neuf autres protéines qui ont été proposées pour former la famille GASP (Simonin *et al.*, 2004). Les gènes codant pour les GASP, excepté GASP-8, sont regroupés dans deux clusters adjacents d'environ 160 et 200 kb localisés sur le locus Xq22 du chromosome X et sont constitués d'un seul exon codant. GASP-8 est codé par deux gènes, le premier est situé sur le chromosome 7 et est constitué de 7 exons qui codent pour deux isoformes, le deuxième est localisé sur le chromosome 3 et est constitué d'un seul exon codant. Ces gènes sont présents uniquement chez les mammifères. Il a par ailleurs été

récemment proposé que les gènes codant pour les GASP seraient issus d'un ancêtre commun, proche de GASP-10, que l'on retrouve chez les poissons téléostéens (Matsuki *et al.*, 2001). La famille GASP se caractérise aussi par la présence d'un motif conservé de 15 acides aminés présent de manière répétée chez les cinq premiers membres de la famille GASP. Localisé dans la portion centrale des GASP, il est répété 22 fois chez GASP-1 et 2 fois chez GASP-2 à GASP-5. La séquence consensus de ce motif est riche en acides aminés chargés et présente 4 résidus centraux quasiment invariants, SWFW, qui forment le cœur du motif. Bien qu'on les retrouve dans d'autres tissus, c'est dans le système nerveux central que les protéines GASP sont le plus fortement exprimées (Simonin *et al.*, 2004), ce qui est en accord avec une fonction liée à la régulation de l'activité des RCPG présents abondamment dans le système nerveux central.

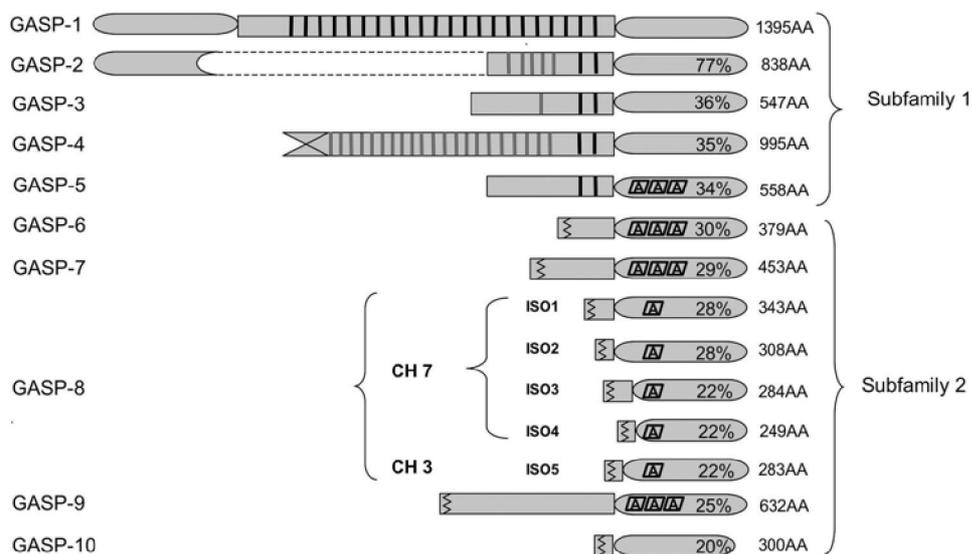


Figure 12 : La famille des protéines GASP.

Figure issue de la publication 1 (voir ci-dessous)

I.2.3. La régulation négative des récepteurs par GASP-1

L'équipe de J. Whistler a proposé que GASP-1 participe à la régulation négative du récepteur DOR en le dirigeant vers le compartiment lysosomal. Des essais réalisés en contexte cellulaire ont notamment montré que la portion carboxyl-terminale de GASP-1, allant des acides aminés 899 à 1395 et nommée cGASP, peut entrer en compétition avec la protéine GASP-1 endogène pour la liaison au récepteur DOR et que sa surexpression favorise le recyclage du récepteur DOR vers la membrane cytoplasmique en jouant le rôle de dominant négatif. À l'inverse, la surexpression de GASP-1 amplifie la dégradation du récepteur DOR suite à sa stimulation prolongée (Whistler *et al.*, 2002).

Une autre étude menée par S. Bartlett et ses collaborateurs a également impliqué GASP-1 dans la dégradation lysosomale du récepteur D2 à la dopamine. En effet, GASP-1 coimmunoprécipite avec le récepteur D2 en contexte cellulaire et dans des extraits de cerveau de rat mais pas avec le récepteur D1 qui recycle vers la membrane cytoplasmique. De plus, la surexpression de cGASP prévient la dégradation lysosomale du récepteur D2 dans des cellules exprimant de manière endogène GASP-1. Des anticorps dirigés contre GASP-1 ont été utilisés afin d'inhiber son interaction avec le récepteur D2 dans des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Ces neurones ont été étudiés en *patch-clamp* sur des coupes de cerveau de rat. Cette technique permet de mesurer la variation du potentiel électrique de membrane sur un neurone isolé. Sa stimulation prolongée avec un agoniste dopaminergique conduit à une diminution progressive de sa réponse électrophysiologique (hyperpolarisation provoquée par l'activation via G_i des canaux K^+ de rectification entrante) qui est liée à la désensibilisation des récepteurs D2. Cette réponse n'est pas retrouvée après une phase de repos sans agoniste ce qui indique que ces récepteurs ne sont pas resensibilisés. L'application d'un anticorps spécifique qui va saturer GASP-1 et l'empêcher d'agir, permet d'obtenir après la phase de repos une nouvelle réponse électrophysiologique suite au renouvellement de la stimulation avec l'agoniste. Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'interaction entre GASP-1 et le récepteur D2 favorise son retour à la membrane cytoplasmique et la resensibilisation des neurones à l'agoniste (Bartlett *et al.*, 2005).

Récemment, deux études ont montré que GASP-1 est impliqué dans la dégradation lysosomale du récepteur CB1 lors de sa stimulation prolongée avec un agoniste cannabinoïde (Martini *et al.*, 2007; Tappe-Theodor *et al.*, 2007). En effet, GASP-1 et le récepteur CB1 coimmunoprécipitent en contexte cellulaire et dans des extraits de cerveau de rat. Ils colocalisent également dans des neurones de striatum et de moelle épinière en culture

primaire ainsi que dans le cerveau de rat et plus particulièrement au niveau de l'hippocampe et du gyrus denté. Dans les neurones de striatum comme dans les neurones de moelle épinière en culture primaire, la stimulation prolongée avec un agoniste cannabinoïde provoque une diminution significative du nombre de récepteurs CB1 qui sont dégradés au niveau du lysosome. Cette diminution peut être prévenue par la surexpression du dominant négatif cGASP qui va se lier au domaine carboxyl-terminal du récepteur CB1 à la place de GASP-1 endogène et l'empêcher ainsi de diriger le récepteur vers le compartiment lysosomal. Les récepteurs CB1 internalisés suivent alors la voie de recyclage et retournent à la membrane cytoplasmique. Ces études montrent ainsi que l'interaction de GASP-1 avec le récepteur CB1 est nécessaire à sa dégradation lysosomale.

GASP-1 favorise la dégradation lysosomale des récepteurs DOR, D2 et CB1 avec lesquels il interagit. Cependant, il est intrigant de constater que GASP-1 interagit également avec des récepteurs qui sont recyclés vers la membrane cytoplasmique comme nous le verrons par la suite (Heydorn *et al.*, 2004; Simonin *et al.*, 2004). Parmi eux, on distingue les récepteurs β 2AR et MOR dont il existe deux mutants qui sont dirigés vers le compartiment lysosomal au lieu d'être recyclés vers la membrane cytoplasmique. Récemment, une étude s'est intéressée à l'interaction en contexte cellulaire de ces deux récepteurs et de leurs mutants avec GASP-1 et GASP-2 son plus proche homologue (Thompson *et al.*, 2007). Le récepteur β 2AR interagit fortement avec GASP-1 et GASP-2 *in vitro* mais pas en contexte cellulaire. En effet, une fois internalisé le récepteur β 2AR va interagir préférentiellement avec la protéine cytoplasmique NHERF qui va promouvoir son recyclage rapide vers la membrane cytoplasmique. Cette interaction est possible grâce à la présence d'un motif PDZ au niveau de l'extrémité carboxyl-terminale du récepteur β 2AR (Cao *et al.*, 1999). Lorsque ce motif est muté, le récepteur n'interagit plus avec NHERF par contre une interaction avec GASP-1 et GASP-2 est alors révélée par coimmunoprécipitation. De plus, le récepteur β 2AR n'est plus recyclé mais dégradé et cette dégradation peut être prévenue par la surexpression du dominant négatif cGASP. Il apparaît donc que l'inhibition de l'interaction avec NHERF rend le récepteur β 2AR accessible à GASP-1 qui va le diriger vers le compartiment lysosomal. Ceci suggère que certains partenaires d'interaction cytoplasmiques des RCPG sont en compétition et que l'orientation de ces RCPG vers la voie du recyclage ou vers la voie de la dégradation soit déterminée par l'affinité de ces partenaires pour les récepteurs. Ainsi l'affinité de la protéine NHERF pour le récepteur β 2AR est plus importante que celle de GASP-1 c'est pourquoi ce récepteur est recyclé. Cette notion d'affinité de liaison est illustrée par le fait que la surexpression de cGASP ne permet de déplacer qu'une fraction des protéines NHERF qui

interagissent avec le récepteur β 2AR sauvage (Thompson *et al.*, 2007). Le récepteur MOR est également recyclé vers la membrane cytoplasmique mais à la différence du récepteur β 2AR, il n'interagit que faiblement avec GASP-1 et GASP-2 *in vitro* ainsi qu'en contexte cellulaire. Le récepteur MOR possède à son extrémité carboxyl-terminale une séquence de recyclage de 17 acides aminés (Tanowitz & von Zastrow, 2003). La délétion de cette séquence favorise la dégradation protéolytique du récepteur. De plus, le récepteur MOR tronqué présente une affinité plus grande pour GASP-1 et GASP-2 ce qui est en contradiction avec ce qui a été observé pour le récepteur β 2AR. Il apparaît donc que la délétion de la séquence de recyclage du récepteur MOR modifie son affinité pour GASP-1 et GASP-2 et l'hypothèse privilégiée par les auteurs de cette étude est que la délétion de cette séquence démasque ou rend accessible un site de liaison pour GASP-1 et -2.

I.2.4. Publication 1

Identification and biological significance of G protein-coupled receptor Associated Sorting Proteins (GASP). Abu-Helo A. and Simonin F. (2010). *Pharmacology & Therapeutics*, **126** :244-250.



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmthera



Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs)

Alaa Abu-Helo, Frédéric Simonin*

Institut de Recherche de l'ESBS, CNRS - Université de Strasbourg, FRE3211, Bld Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Keywords:
GPCR
Receptor down-regulation
Sorting
Modulation of transcription
Cancer
Neurodegenerative disorder

ABSTRACT

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the most abundant protein families encoded by the human genome. They are involved in the modulation of numerous physiological functions and represent major drug targets. Their activity is tightly controlled by a vast array of interacting partners that modulate their membrane targeting, intracellular trafficking and signalling properties. Among them, several proteins from the same family, G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASP), have been shown to display a broad spectrum of interactions with GPCRs. In addition to their postulated role in the modulation of the post-endocytic sorting of these receptors, recent data indicate that several GASPs may modulate the transcriptional activity of the cell through their interaction with transcription factors. However, no clear molecular function has been assigned yet to this protein family. In this review, we describe the discovery of GASPs, their major features, interacting partners, functions and possible involvement in pathological situations including neurodegenerative diseases and cancer.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	244
2. Discovery of GASPs	245
3. Molecular characterization of GASPs	245
4. Functions of GASPs	248
5. GASPs and diseases	249
6. Conclusion	249
Acknowledgments	250
References	250

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent one of the most abundant protein families encoded by the human genome. By the most recent estimations there are a total of 799 sequence verified human GPCRs, of which 369 respond to endogenous ligands (see

Lagerstrom & Schioth, 2008). These ligands display an extraordinary diversity, including amino acids, Ca²⁺ ions, peptides, lipid-like substances and large glycoprotein hormones. In animals, all physiological functions are modulated by complex equilibriums between different subsets of GPCRs. From a pharmaceutical point of view, these receptors are targeted by around 40% of all drugs available on the market (see Jacoby et al., 2006; Eglen et al., 2007). Noticeably, these compounds act through less than 50 different GPCRs leaving more than 300 receptors as potential targets for the development of therapeutic agents (see Lagerstrom & Schioth, 2008).

The activity of GPCRs is tightly regulated. Particularly, they interact with a vast repertoire of GPCR interacting proteins (GIPs) that display important functions, including the targeting of receptors to specific subcellular compartments, their trafficking to and from the plasma membrane and the fine-tuning of their signalling properties (see Bockaert et al., 2004). Consequently, if we want to discover and

Abbreviations: ALEX, arm protein lost in epithelial cancers; ARM, armadillo repeat-containing protein; bHLH, basic helix–loop–helix; BAIP3, BARD1 associated interacting protein 3; BARD1, Breast cancer 1-associated ring domain protein 1; CNS, central nervous system; C-tail, C-terminal tail; GASP, G protein-coupled receptor associated sorting protein; GIP, G protein-coupled receptor interacting protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HIP, huntingtin interacting partner; htt, huntingtin; IPO5, importin 5; NGF, nerve growth factor; PPP2R5E, protein phosphatase 2 regulatory subunit-B' epsilon isoform; PTN, pleiotrophin; SVH, specific splicing variant involved in hepatocarcinogenesis.
* Corresponding author. Tel.: +33 368 85 48 75; fax: +33 368 85 48 29.
E-mail address: simonin@unistra.fr (F. Simonin).

optimize new therapeutic agents targeting GPCRs we must appreciate the functioning of these novel interacting partners.

With the exception of arrestins, for which the interaction with numerous GPCRs has been largely demonstrated (see Pierce et al., 2002), most GIPs modulate the function of only one or a small subset of GPCRs. Some are transmembrane proteins while other are cytosoluble and mainly interact with the C-terminal tail (C-tail) of receptors. In this review, we will describe the discovery and potential functions of a novel family of proteins, the so-called GPCR associated sorting proteins (GASPs). Like arrestins, they display a broad spectrum of interaction with GPCRs and may therefore represent an important family of proteins regulating GPCR physiology.

2. Discovery of GASPs

The first member of the GASP family was originally identified by a Japanese group using the PAS domain of rat Period1 as bait in a two-hybrid screen of a cDNA library from rat suprachiasmatic nucleus (Matsuki et al., 2001). This protein was therefore called PIPS (Period1 interacting protein of the suprachiasmatic nucleus). It was further shown to display a strong sequence homology with a human protein, KIAA0443, identified at the Kazusa DNA Research Institute in a project aiming to identify cDNA clones from brain encoding large proteins (Ishikawa et al., 1997). Soon after, Whistler et al. (2002) reported the identification of the same protein in a two-hybrid screen using the carboxyl-terminal tail (C-tail) of delta opioid receptor as bait. They named it G protein-coupled associated sorting protein (GASP) due to its implication in post-endocytic sorting of this receptor. Using a similar approach we also isolated this protein, that we called GASP-1, and further described nine additional human proteins that displayed significant sequence homologies with GASP-1 (GASP-2 to -10); Fig. 1; (Simonin et al., 2004). At around the same time, GASP-2 was also identified in a large two-hybrid screen as an interacting partner of huntingtin and was therefore called HIP15 (huntingtin interacting partner 15; Goehler et al., 2004). Presently, official names from HUGO (Human Genome Organization) Gene Nomenclature Committee for GASP-1 and GASP-2 are GPRASP-1 and GPRASP-2 due to possible

confusion with a *Drosophila* protein called Gasp. GASP-3 was cloned by 5'-RACE-RT-PCR from a brain cDNA library and was called p60TRP (p60-transcription-regulator-protein) due to the presence of a putative myc-type basic helix-loop-helix (bHLH) sequence at its C-terminus (Heese et al., 2004) and has now been renamed bHLH-B9. GASP-6 was originally identified in a two-hybrid screen using the peroxisome protease PP110 as bait (Kurochkin et al., 2001). As its sequence contains an armadillo repeat, and its expression was found to be lost or significantly reduced in several human carcinomas it was therefore called ALEX-1 for arm protein lost in epithelial cancers on chromosome X (Kurochkin et al., 2001). In the same study, GASP-7 and GASP-9 were shown to display strong sequence homologies with ALEX-1 and were therefore named ALEX-2 and ALEX-3. Four different splice variants were shown to originate from the GASP-8 gene. Due to the potential involvement of one of them in hepatocarcinogenesis, they were named specific splicing variants involved in hepatocarcinogenesis A, B, C and D (SVH-A, -B, -C and -D) and were shown to be close homologues of ALEX proteins (Huang et al., 2003). Based on these studies, sequence homologies suggesting the presence of a conserved armadillo motif in their sequences and the localization of their gene on chromosome X, GASP-4, -5, -6, -7, -9 and -10 were officially named ARMXC-1 to -6, while GASP-8 whose gene is localized on chromosome 7, was named ARMCI0. Table 1 summarizes the different names and corresponding references of all the members of the GASP family.

3. Molecular characterization of GASPs

3.1. GASPs are members of a single gene family

Despite the lack of homogeneity in the official nomenclature, as discussed above, there is a variety of evidences showing that GASP-1 to -10 belong to the same protein family. First of all, GASP-1 to -10 display significant sequence similarities. As shown in Fig. 1, they share a conserved C-terminal domain of 250 amino acids. This region displays 20 to 77% sequence identity in pairwise comparisons between GASP-1 and other GASPs. In addition, we have identified a highly conserved and repeated motif of fifteen amino acids that is

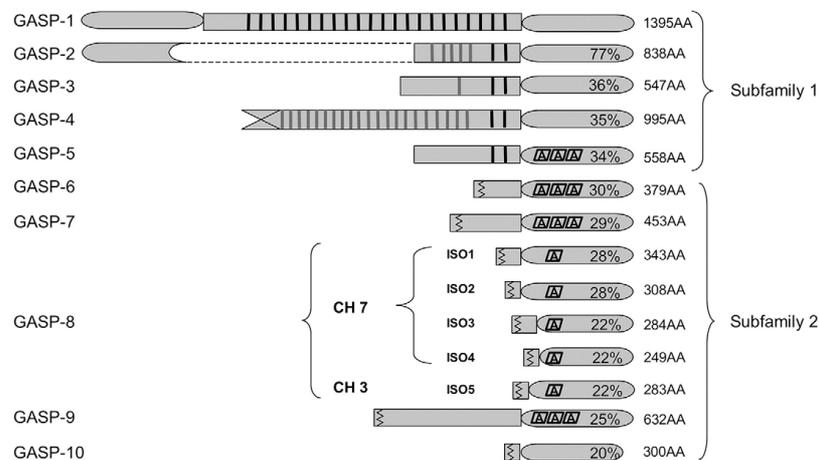


Fig. 1. Sequence comparisons were performed with full-length human sequences from the Uniprot database (see Table 1 for accession numbers) except for GASP4, which was a partial sequence from mouse. The percentage of identical amino acids shared with GASP-1 is indicated within each box corresponding to the C-terminal domain of 250 amino acids. Bold black lines represent the conserved motif of 15 amino acids found in GASP-1 to -5. The consensus sequence for this repeated motif is [E/D/G] [E/D] E X [I/L/V/S/T] [I/V/A/F] [G/N] [S/T] W F W [A/V/T/S/D/E] [G/E/R] [E/D/K] [E/D/K/A/Q]. Bold grey lines represent repeated motifs that do not perfectly match the consensus sequence. Broken lines represent putative transmembrane domains. Parallel rectangles with small capital A represent putative armadillo repeats; they are present in one member of GASP subfamily 1 (GASP-5) and in all members of GASP subfamily 2, except GASP-10.

Table 1
The GASP family: accession numbers, official names and synonyms.

Name	Number of aa	Uniprot accession number	Official Name (HUGO Gene Nomenclature Committee)	Synonyms	References for synonyms
GASP-1	1395	Q5JY77	GPRASP1	KIAA0443 PIPS	(Ishikawa et al., 1997) (Matsuki et al., 2001)
GASP-2	838	Q96D09	GPRASP2	HIP15	(Goehler et al., 2004)
GASP-3	547	Q9C0G2	bHLHB9	KIAA1701 p60TRP	(Nagase et al., 2000) (Heese et al., 2004)
GASP-4 ^a	995	Q8K2R3	ARMCX4		
GASP-5	558	Q6P1M9	ARMCX5		
GASP-6	379	Q99UH62	ARMCX3	ALEX3	(Kurochkin et al., 2001)
GASP-7	453	Q9P291	ARMCX1	ALEX1	(Kurochkin et al., 2001)
GASP-8	343	Q8N2F6-1	ARMC10-1	SVH-A	(Huang et al., 2003)
Isoform 1					
Isoform 2	308	Q8N2F6-2	ARMC10-2	SVHB	
Isoform 3	284	Q8N2F6-3	ARMC10-3	SVHC	
Isoform 4	249	Q8N2F6-4	ARMC10-4	SVHD	
Isoform 5 ^b	283				
GASP-9	632	Q7L311	ARMCX2	KIAA0512 ALEX2	(Nagase et al., 2000) (Kurochkin et al., 2001)
GASP-10	300	Q7L4S7	ARMCX6		

^a The GASP-4 reference sequence is a partial sequence from *Mus musculus*. A putative human orthologue corresponding to a full-length sequence of 2380 amino acids has been deduced from the analysis of the human genome.

^b The sequence of human GASP-8 isoform 5 was deduced from chromosome 3 sequence analysis.

present outside the conserved C-terminal domain in several GASPs (Fig. 1). On this basis, we propose that GASPs could be divided into subfamily 1 (including GASP-1 to -5), that contains the repeated motif, and subfamily 2 (including GASP-6 to -10), that does not contain this motif, but for which the presence of a transmembrane region near the N-terminus and the existence of armadillo repeats located within the conserved C-terminal region have been proposed (see Fig. 1).

Another common feature of GASPs is their genomic localization and organization. With the exception of GASP-8, GASP genes form two clusters on human chromosome loci Xq22.1–q22.2. They all contain a single protein coding exon that includes the totality of the 3' non-coding sequence. Although the number and organization of the 5' non-coding exons differ between GASP genes, conserved sequences were identified in the 5' UTRs of all GASP genes (Winter & Ponting, 2005). Two copies of the GASP-8 gene are present in the human genome and are located on chromosome seven and chromosome three. The first one contains seven protein coding exons and gives rise to four splice isoforms, while the second is a single protein coding exon like other GASP genes. The two protein sequences of GASP-8 are identical except that GASP-8 from chromosome three misses two small sequences of 34 and 25 amino acids corresponding to exon 2 and exon 6 sequences (respectively) of GASP-8 gene from chromosome 7. These data strongly suggest that these genes have evolved from a common ancestor (Simonin et al., 2004; Winter & Ponting, 2005). Moreover, in depth genomic sequence analysis has revealed that GASP genes (except GASP-8) are located within a region of chromosome X that is specific to placental mammals. This region (Xq22.1–q22.2) contains three gene families with divergent coding sequences but a conserved sequence motif in their 5'UTRs, BEXs (brain expressed X-linked; five genes), WEXs (WWbp5-like X-linked; nine genes) and GASPs (ten genes). These are most likely derived from a common single ancestor, probably a GASP-like gene, found in early-branching bony vertebrates (Winter & Ponting, 2005). Indeed, apart from GASP-10, for which a homologous sequence was found in the teleost fish, *Danio rerio*, no homologues were found for BEX, WEX and GASP genes outside mammals.

Altogether, these observations strongly suggest that GASP genes indeed form a single gene family that is present only in mammals. As

the official nomenclature does not presently take this fact into account, in this review we have decided to use the term GASP for all the members of this gene family, although their capacity to interact with GPCRs has not been investigated for all the members (see Section 3.2.1 below). In future, the official nomenclature will probably need to be revised to assign the same name to all members of this family of proteins.

3.2. Interacting partners of GASPs

Analysis of protein–protein interactions is a valuable approach for characterizing proteins of unknown function or for identifying novel functions or signalling pathways in which proteins are involved. The following section summarizes the different interacting partners that have been identified for GASPs and the possible relevance of these interactions.

3.2.1. Interactions with GPCRs

Among the different proteins that have been shown to interact with GASP, GPCRs are the best documented. GASP-1 has been shown to interact *in vitro* with more than 30 different GPCR C-tails from families A, B and C including delta opioid, dopamine D2 and D4, beta-1 and beta-2 adrenergic, muscarinic M1 and M2, kinin B1, cannabinoid CB1, thromboxane A2, calcitonin, and mGluR1a receptors (Whistler et al., 2002; Heydorn et al., 2004; Simonin et al., 2004; Bartlett et al., 2005; Enquist et al., 2007; Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007; Thompson et al., 2007). To our knowledge, besides arrestins and GPCR kinases, GASP-1 is the GIP that displays the broadest spectrum of interactions with GPCRs. In these studies the C-tail of GPCRs was clearly shown to be a critical region for interaction with GASP-1. Moreover, we have shown by site directed mutagenesis that conserved residues present in the putative helix 8 of delta opioid and beta-1 adrenergic receptor C-tails are essential for the interaction with GASP-1 suggesting that helix 8 may be a major site of contact with GASPs (Simonin et al., 2004). Much less is known about which region of GASP-1 is responsible for the interaction with GPCR C-tails. Although we originally proposed that the conserved carboxyl-terminal domain of GASP is responsible for the interaction with GPCRs, recent data indicates that, in addition to this domain, the small highly conserved repeated motif of fifteen amino acids present in GASP-1 (Fig. 1) is critically involved in this interaction (Boeuf et al., submitted for publication). The interaction of GASP-1 with GPCRs was confirmed in co-immunoprecipitation experiments for delta opioid, dopamine D2, and cannabinoid CB1 receptors (Whistler et al., 2002; Simonin et al., 2004; Bartlett et al., 2005; Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007). Interestingly, for beta-2 adrenergic and mu opioid receptors, the interaction with GASP-1 was only revealed in transfected cells when mutant forms of these receptors were expressed (Thompson et al., 2007). This study suggested that the interaction between the wild-type form of the receptor and GASP-1 was inhibited either by the interaction with another cellular partner, NHERF/EBP50 (sodium–proton exchange regulatory factor/ezrin-binding phosphoprotein 50), in the case of beta-2 adrenergic receptor, or by the presence within the C-tail of the mu receptor of a sequence that directly inhibits this interaction. GASP-1 was also shown to be co-expressed in neurons expressing dopamine D2 and cannabinoid CB1 receptors (Bartlett et al., 2005; Tappe-Theodor et al., 2007). Altogether these data provide strong evidence that GASP-1 interactions with GPCRs may occur under physiological conditions.

Concerning the other GASPs, it has been shown that GASP-2 can interact *in vitro* with several GPCR C-tails including beta-1 and beta-2 adrenergic, calcitonin and dopamine D2 receptors (Simonin et al., 2004; Thompson et al., 2007). Moreover, our recent data show that GASP-3, -5 and -7 can also interact *in vitro* with different GPCR C-tails (Boeuf et al., submitted for publication). These results suggest that the different members of the GASP family share not only sequence

homologies, similar gene organization and localization, but also a common GPCR binding activity.

3.2.2. Other partners

In addition to GPCRs, several different proteins have been shown to interact with GASPs. Most of these interacting partners have been identified in two-hybrid screens and, in several cases, the physiological relevance of these interactions has not been investigated further. As mentioned above, GASP-1 has been shown to interact with Period-1 using different approaches, including yeast two-hybrid, GST-pull down, and co-immunoprecipitation experiments (Matsuki et al., 2001). Period-1 is one of the essential elements involved in the transcription/translation-based auto-regulatory loop of the endogenous master clock (see Cermakian & Sassone-Corsi, 2000). Moreover, Period-1 has been shown to promote the translocation of GASP-1 from cytoplasm to nucleus in cultured cells suggesting that this interaction could be physiologically relevant (Matsuki et al., 2001). Growth factor receptor-bound protein 2-associated-binding protein 1 (Gab1) has been demonstrated by the same group to co-immunoprecipitate with endogenous GASP-1 (Kiyama et al., 2006). This result, together with data showing that GASP-1 is involved in nerve growth factor mediated neuronal survival (Kiyama et al., 2006), suggests that GASP-1 could be involved in the modulation of the activity of single transmembrane receptors as well. In a recent study, GASP-1 has been identified by mass spectrometry as one of the numerous proteins (391) that co-sediment with microtubules (Sakamoto et al., 2008). However, the precise interacting partner within microtubules was not identified in this study, and interaction could not be confirmed by other methods. Involvement of microtubules in a variety of cellular functions, including vesicle transport, is consistent with the proposed function of GASP-1 in post-endocytic sorting of GPCRs.

GASP-2 was identified in large two-hybrid screens conducted with huntingtin (htt) fragments or its interacting partners as baits (Goehler et al., 2004). This approach allowed the characterization of a protein interaction network centered on huntingtin, in which GASP-2 interacts with huntingtin and four other partners, htt interacting partner 5 (HIP5), Breast cancer 1-associated ring domain protein 1 (BARD1), BARD1 associated interacting protein 3 (BAIP3) and pleiotrophin (PTN). While HIP-5 and BAIP3 have no known function, BARD1 is a nucleocytoplasmic protein that has been involved in several functions including DNA repair and modulation of transcription (Irminger-Finger & Jefford, 2006). PTN is a secreted protein involved in growth, survival and migration of various cell types (Muramatsu, 2002). Concerning htt, although the presence of an expanded polyglutamine tract in the N-terminal part of this protein has been clearly involved in Huntington disease, its physiological function remains unclear (Cattaneo et al., 2005). In the same study, GASP-9 was identified as an interacting partner of vimentin (VIM), which is a member of intermediate filament family. These different interactions were not further characterized, except the one between GASP-2 and htt that has been shown to occur in mammalian cells both by co-immunoprecipitation and co-localization experiments, raising the possibility that GASP-2 interacts with htt under physiological conditions (Horn et al., 2006). As htt has been involved in vesicle transport, it might influence receptor trafficking via interaction with GASP-2 (Horn et al., 2006).

Two other interacting partners, protein phosphatase 2 regulatory subunit-B' epsilon isoform (PPP2R5E) and importin 5 (IPO5), were identified for GASP-3 using both two-hybrid and co-immunoprecipitation experiments with mammalian cells heterologously overexpressing GASP-3 (Heese et al., 2004). PPP2R5E belongs to the phosphatase 2A regulatory subunit-B family. Protein phosphatase 2A is one of the four major Ser/Thr phosphatases, and is implicated in the negative control of cell growth and division. Importin 5 is involved in the nuclear import of proteins containing a nuclear localization

signal. However, GASP-3 does not contain any consensus sequence corresponding to a nuclear localization signal.

In a very recent work, GASP-6 was shown to physically and functionally interact with the developmental regulatory factor, Sox10 (Mou et al., 2009). Using a combination of techniques, Mou et al. convincingly showed that GASP-6 and Sox10 are endogenously co-expressed in brain and numerous brain-derived cell lines, where they interact at the level of the outer membrane of mitochondria. They further mapped the region of interaction between GASP-6 and Sox10 in the conserved C-terminal domain of GASPs.

Regarding GASP-7, its interaction with PP110, a protease from peroxisome originally identified from a two-hybrid screen, was not further characterized (Kurochkin et al., 2001). Finally, GASP-8 interacts with p53 as shown by GST-pull down and co-immunoprecipitation experiments in various cells, heterologously or endogenously co-expressing both proteins (Zhou et al., 2007). However, the physiological relevance of this interaction will need further investigation since GASP-8 has been shown to be mostly expressed in the endoplasmic reticulum where p53 is not present.

The different interacting partners of GASPs and the main methods that were used to characterize these interactions are summarized in Table 2. Among all interacting partners identified for the different GASPs, only GPCRs, Period1, htt, PPP2R5E, IPO5, Sox10 and p53 were shown to interact with different GASPs using at least two different methods suggesting that these interactions are relevant and could have physiological implications. It is interesting to note that in addition to GPCRs three different proteins involved in the modulation of transcription (Period1, Sox10 and p53) have been consistently shown to interact with different GASPs.

3.3. Distribution and subcellular localization

Another important feature that can give clues to identifying protein functions is their expression pattern and their subcellular localization.

Although GASPs seem ubiquitously expressed (Kurochkin et al., 2001; Simonin et al., 2004), they are all highly or predominantly expressed in the central nervous system (CNS). Since more than 90% of GPCRs are also expressed in the CNS, this pattern of expression is consistent with an interaction of GASP with GPCRs, and with their involvement in the modulation of activity of these receptors. Moreover, as GASP genes are located in a region of chromosome X, which appears to be an innovation of placental mammals, it is tempting to speculate that GASPs, together with other gene products from this region, could be involved in the adaptive evolution of the neocortex, a region of the forebrain which is unique to mammals (Winter & Ponting, 2005).

The subcellular distribution of several GASPs has been studied either in transfected cells or in cells or organs endogenously expressing GASPs. GASP-1 cellular expression is described in several reports both in heterologous cells or in neurons and neuron-derived cell lines endogenously expressing this protein (Matsuki et al., 2001; Whistler et al., 2002; Bartlett et al., 2005; Kiyama et al., 2006; Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007). In all cases, GASP-1 was found to be mostly located in the cytoplasm. When co-expressed in COS-7 cells (that do not express endogenous GASP-1) with Period1, GASP-1 was translocated to the nucleus (Matsuki et al., 2001). In PC12 cells (that do express endogenous GASP-1), a minor fraction of GASP-1 was found in cell nuclei and this fraction increased upon nerve growth factor (NGF) treatment (Kiyama et al., 2006).

Expression of endogenous GASP-2 was studied by confocal immunofluorescence microscopy in neuroblastoma cells SH-SY5Y (Horn et al., 2006). It was found to be expressed in the cytoplasm and cell membranes of undifferentiated cells, and in newly formed neurite-like extensions of retinoic acid-induced differentiated cells. On the other hand, GASP-2 has been identified as a nuclear phosphoprotein

Table 2
Interacting partners of GASPs and principle methods used for their identification.

GASPs	Interacting partners	Methods used for characterization*	References
GASP-1	GPCRs	T-H, GST-PD, Co-IP, Co-loc	(Whistler et al., 2002; Simonin et al., 2004; Heydorn et al., 2004; Bartlett et al., 2005; Engquist et al., 2007; Thompson et al., 2007; Martini et al., 2007; Tappe-Theodor, 2007)
GASP-2	Period 1	T-H, GST-PD, Co-IP, Co-loc	Matsuki et al., 2001
	Gab 1	Co-IP	(Kiyama et al., 2006)
	Microtubules	OBM	(Sakamoto et al., 2008)
	GPCRs	GST-PD	(Simonin et al., 2004; Thompson et al., 2007)
	HIP15	T-H	(Goehler et al., 2004)
	BARD1	T-H	(Goehler et al., 2004)
GASP-3	BAIP3	T-H	(Goehler et al., 2004)
	PTN	T-H	(Goehler et al., 2004)
	htt	T-H, Co-IP, Co-loc	(Goehler et al., 2004; Horn et al., 2006)
	GPCRs	GST-PD	Bœuf et al., submitted for publication
	PPP2R5E	T-H, Co-IP	(Heese et al., 2004)
GASP-5	IPO5	T-H, Co-IP	(Heese et al., 2004)
	GPCRs	GST-PD	Bœuf et al., submitted for publication
GASP-6	Sox10	T-H, Co-IP, Co-loc, OBM	(Mou et al., 2009)
GASP-7	GPCRs	GST-PD	Bœuf et al., submitted for publication
GASP-8	PP110	T-H	(Kurochkin et al., 2001)
	p53	GST-PD, Co-IP	(Zhou et al., 2007)
GASP-9	VIM	T-H	(Goehler et al., 2004)

*T-H, Two-hybrid; GST-PD, GST-pull down; Co-loc, Co-localization; Co-IP, Co-immunoprecipitation; and OBM, other biochemical method.

from HeLa cells in a large scale proteomic study indicating it can also be localized into the cell nucleus (Beausoleil et al., 2004). Noticeably, the phosphorylated sequence of GASP-2 that was characterized in this study is also strongly conserved in GASP-1, suggesting that its activity could be modulated by such a post-translational modification.

GFP-fused GASP-3 transfected in PC12 cells was mainly expressed in the cytoplasm, although it could also be detected in the nucleus of some cells (Heese et al., 2004). Myc-tagged GASP-6, when overexpressed in OBL21 cells that express endogenous GASP-6, was shown to be a cytoplasmic protein with a punctate staining (Mou et al., 2009). It was further found to co-localize with the mitochondrial protein, Cox IV, both by immunofluorescence and subcellular fractionation experiments. Further biochemical experiments conducted on isolated mitochondria revealed that GASP-6 is exposed on the outer surface of this organelle. All variants of GASP-8, when fused to GFP and overexpressed in QSG-7701 cells that endogenously express GASP-8 variants, were localized in the cytoplasm and nuclear envelope (Huang et al., 2003). Co-localization with organelle-specific dyes revealed that, within the cytoplasm, all GASP-8 variants were associated with the endoplasmic reticulum. Epitope-tagged GASP-9 was similarly transfected in testicular Leydig cells that display endogenous expression of this protein and was detected in discrete membrane structures within the cytoplasm. Antibody markers used to identify organelles suggested that GASP-9 was not specifically localized with either endoplasmic reticulum or perinuclear Golgi apparatus (Smith et al., 2005).

Overall, these data indicate that GASPs are mainly localized in the cell cytoplasm. In some cases, members of the GASP subfamily 1 (GASPs 1 and 3) can display a nucleocytoplasmic localization suggesting that these proteins could shuttle between both compartments under particular physiological conditions. Within the cytoplasm, some

members of the GASP subfamily 2 seem to be associated with the membranes of organelles, like mitochondria or endoplasmic reticulum, and the nuclear envelope. These data are in agreement with the presence of a putative transmembrane domain near the N-terminus for all members of this subfamily (Fig. 1).

4. Functions of GASPs

Although no clear molecular function has been assigned to this protein family, several studies point to their implications in at least two different cellular activities.

4.1. Modulation of the activity of GPCRs

In their initial report, using a dominant negative mutant of GASP-1, Whistler et al. (2002) provided evidence that GASP-1 was implicated in the degradation of delta, but not mu, opioid receptors following their stimulation and endocytosis. From this study they proposed that GASP-1 is implicated in the post-endocytic sorting of « fast degrading » receptors, like delta, but not in that of « slow degrading receptors », like mu. However, this study was conducted exclusively in heterologous cells (HEK-293) providing no evidence for a similar role of GASP-1 in a physiologically relevant context. This question was addressed in subsequent studies from this group and others. Like for delta opioid receptor, GASP-1 was involved in the degradation of dopamine D2 receptor, a fast degrading receptor, in heterologous cells (Bartlett et al., 2005). Moreover, in the same study, GASP-1 was shown to be endogenously co-expressed with dopamine D2 receptors in dopaminergic neurons from the ventral tegmental area. Using patch-clamp electrophysiology, it was shown that the D2 receptor rapidly desensitizes following agonist stimulation and that neutralisation of the D2 receptor - GASP-1 interaction, by injecting GASP-1 antibody into recorded neurons, can partially restore response to the D2 agonist following sustained stimulation. Similar observations were made with cannabinoid CB1 receptors (Martini et al., 2007; Tappe-Theodor et al., 2007). GASP-1 was shown to interact with CB1 receptors both in heterologous cells and neurons, and expression of the GASP-1-dominant negative mutant in those cells inhibited CB1 receptor degradation. Moreover, viral overexpression of this mutant in the dorsal horn of the spinal cord, where both GASP-1 and CB1 receptors are expressed, reduced the development of cannabinoid antinociceptive tolerance (Tappe-Theodor et al., 2007). These data led to the hypothesis that preventing GASP-1 interactions with GPCRs might provide a means to limit the decrease in receptor signalling upon sustained agonist treatment (Bartlett et al., 2005; Tappe-Theodor et al., 2007).

Very recently, we have generated GASP-1 knockout mice and tested the hypothesis that overstimulation of dopamine receptors using chronic cocaine treatment would result in enhanced sensitivity in these animals (Boeuf et al., 2009). Surprisingly, we observed a decreased sensitivity of GASP-1 knockout animals to both acute and chronic treatments. Moreover, when we measured the levels of dopamine and muscarinic receptors in the striatum of GASP-1 knockout mice following cocaine self-administration experiments, we observed a stronger down-regulation of those receptors in GASP-1 deficient animals compared to wild-type littermates. Although these data are in agreement with a role of GASP-1 in post-endocytic sorting of GPCRs, they suggest that upon sustained stimulation, GASP-1 would stimulate recycling rather than receptor degradation (Boeuf et al., 2009).

In the future, further studies will be needed to identify the precise molecular function of GASP-1 in the modulation of GPCR activity together with the role of other GASPs in these phenomena.

4.2. Modulation of transcription

There are several lines of evidence suggesting that different members of the GASP family could be implicated in the modulation of

transcription. The first one came from the original characterization of GASP-1 by Matsuki et al. (2001) who showed that GASP-1 can interact with Period-1 and that co-expression of both proteins in the same cells promotes the targeting of GASP-1 to the nucleus. However, in this study there was no direct demonstration of the capability of GASP-1 to modulate transcription. In a second study, the same group showed that a NGF treatment of PC12 cells caused a nuclear translocation of GASP-1 (Kiyama et al., 2006). Moreover, NGF rescue of PC12 cells from apoptotic cell death was diminished in cells pre-treated with GASP-1 siRNA. Again, although there was no direct demonstration, these data suggested that, upon NGF-mediated nuclear translocation, GASP-1 could modulate transcription thus protecting cells from apoptosis (Kiyama et al., 2006).

GASP-3 has been officially named bHLH-B9 due to the presence in its sequence of a putative basic helix–loop–helix motif characteristic of the family of bHLH transcription factors. When transfected in CHO cells, GASP-3 was detected mainly in the cytoplasm but also in the nucleus of some cells (Heese et al., 2004). On the other hand, PC12 cells treated with GASP-3 siRNA were slightly more sensitive to apoptosis induced by serum withdrawal. As for GASP-1, these data suggest a possible involvement of GASP-3 in transcriptional modulation but there is still no direct demonstration of any transcriptional activity or direct interaction with DNA or other bHLH transcription factors.

Experimental data implicating GASP-6 in the modulation of transcription are much stronger. As indicated above, GASP-6 has been shown to be localized in the outer membrane of mitochondria where it can interact with the transcription factor, Sox10 (Mou et al., 2009). Moreover, overexpression of GASP-6 was shown to increase the amount of Sox10 in the mitochondrial fraction, and transactivation of the gene promoters for the nACh receptor $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits was enhanced by GASP-6. This activity was lost when the Sox10-interacting domain of GASP-6 was deleted, indicating that a direct interaction between the two proteins is necessary to generate a transcriptional response. To explain how a cytoplasmic protein, like GASP-6, increases the transcriptional regulatory function of Sox10, Mou and collaborators proposed that its interaction with GASP-6 within the cytoplasm could lead to post-translational modifications of Sox10 that may result in an increased transcriptional activity once transported into the nucleus (Mou et al., 2009). This study is particularly interesting since Sox10 has been implicated in the development of the central nervous system, including glial cell development and differentiation (Herbarth et al., 1998; Britsch et al., 2001), and specification of neural crest-derived sensory and enteric neurons, and melanophores (Elworthy et al., 2003; Elworthy et al., 2005; Carney et al., 2006). These data are thus in good agreement with the hypothesis of Winter and Ponting (2005), suggesting that GASPs could be involved in the adaptive evolution of the neocortex.

Isoform 2 of GASP-8 has been shown to accelerate cell growth when overexpressed in a normal liver cell line (QSG-7701), and inhibition of this isoform in hepatoma cells using either antisense oligonucleotides or RNAi induces cell apoptosis (Huang et al., 2003; Zhou et al., 2007). Furthermore, this induction of apoptosis was shown to be dependent on p53, and a direct interaction between both proteins was shown. Finally, Zhou et al. (2007) showed that this isoform inhibited the transcriptional activity of p53 in two different cell lines with endogenous wild-type p53 or inducible-p53. Although, how GASP-8 isoform 2, which is mostly localized in the endoplasmic reticulum, can modulate the transcriptional activity dependent on p53 still needs to be clarified.

In conclusion, two different members of GASP subfamily 2 (GASP-6 and -8) have been convincingly shown to modulate transcription through their interaction with transcription factors while some data suggest that two different members of the GASP subfamily 1 (GASP-1 and -3) could be involved in the modulation of transcription via their targeting to the cell nucleus.

5. GASPs and diseases

There are few reports of GASPs in pathological situations. Most of them are based on transcriptomic studies showing alteration of mRNA levels of different GASPs. Except for two studies, one showing that GASP-3 mRNA level is decreased in the brain of Alzheimer's disease patients (Heese et al., 2004), and a second one that places GASP-4 in a list of 892 highly dysregulated priority genes in the brain of Parkinson's disease patients (Moran & Graeber, 2008), all other reports describe the possible involvement of GASPs in cancer. Aberrant methylation of GASP-1 promoter CpG islands was found in 2 out of 13 melanoma cell lines but not in 2 cultured normal melanocytes (Furuta et al., 2006). However, this methylation did not consistently repress GASP-1 gene expression. It is therefore unlikely that GASP-1 is involved in melanoma development and progression. Conversely, hypermethylation of the GASP-3 gene promoter CpG islands has been identified in several colorectal cancer cell lines and primary tumours, and was associated with a loss of expression in each case (Jacinto et al., 2007). These results underlie a potential role for GASP-3 in cellular transformation. GASP-3 and GASP-2 also displayed significantly altered expression levels in head and neck squamous-cell carcinomas from patients initially treated by surgery who developed metastases compared to those that did not (Rickman et al., 2008). GASP-5 gene promoter was shown to be a target of the oncogene, ZNF217 (putative oncogene that contain eight zinc fingers), which plays a key role during neoplastic transformation (Krig et al., 2007). However, while most genes identified in this study are repressed by ZNF217, in agreement with its proposed function as a transcriptional repressor, the GASP-5 gene was activated. Expression of GASP-7 and GASP-9 transcripts were lost or significantly reduced in human lung, prostate, colon, pancreas and ovarian carcinomas, and also in cell lines established from different human carcinomas (Kurochkin et al., 2001). Finally, isoform 2 of GASP-8 was shown to be upregulated in hepatocellular carcinomas. In addition, human liver cell lines overexpressing this isoform specifically acquired an accelerated growth rate and tumorigenicity in nude mice, whereas its inhibition in a hepatoma cell line, using antisense oligonucleotides or RNAi, induced apoptosis (Huang et al., 2003; Zhou et al., 2007).

Altogether these reports suggest that expression of several members of the GASP family is dysregulated in some neurodegenerative disorders and cancer cells, and could play some role in tumorigenesis. This possibility is particularly appealing if one considers that several members of the GASP family have been shown to modulate the transcriptional activity of the cell and apoptotic cell death.

6. Conclusion

Despite their very different sizes, ranging from 249 to 1395 amino acids, GASPs share many common features both in terms of sequence similarities, gene organization and functions. The GASP subfamily 1 is clearly involved in the modulation of GPCR activity and could modulate transcription, while the GASP subfamily 2 is mostly involved in the modulation of transcription, particularly through interactions with known transcription factors. Considering these two functions, it is tempting to speculate that, upon activation of GPCRs (and possibly other receptor types), GASPs could be involved in their sorting toward degradation or recycling, and concomitantly in receptor-induced modulation of the transcriptional activity of the cell. This dual function is reminiscent of β -arrestins, which are involved in GPCR desensitization and play a role as adaptor proteins that facilitate the activation of different signalling cascades following activation of GPCRs and other receptors (see Lefkowitz & Shenoy, 2005). Further studies are now required to better understand the precise molecular function of these proteins and to evaluate whether they could represent interesting pharmacological targets for the treatment of neurodegenerative diseases and cancer.

Acknowledgments

This study was supported by The Centre National de la Recherche Scientifique and the Université de Strasbourg (AA and FS), the Association pour la Recherche sur le Cancer (FS, no. 3423), Fondation pour la Recherche Médicale (FS) and a fellowship from Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (AA). We thank Renaud Wagner and Jeremy Garwood for critical reading of the manuscript.

References

- Bartlett, S. E., Enquist, J., Hopf, F. W., Lee, J. H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W. S., Armstrong, R., Bonci, A., & Whistler, J. L. (2005). Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11521–11526.
- Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villen, J., Li, J., Cohn, M. A., Cantley, L. C., & Gygi, S. P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12130–12135.
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A., & Marin, P. (2004). GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103, 203–221.
- Boeuf, J., Trigo, J. M., Moreau, P. H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J. C., Mathis, C., Klosin, P., Maldonado, R., & Simonin, F. (2009). Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 30, 860–868.
- Britsch, S., Goerich, D. E., Riethmacher, D., Peirano, R. L., Rossner, M., Nave, K. A., Birchmeier, C., & Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15, 66–78.
- Carney, T. J., Dutton, K. A., Greenhill, E., Delfino-Machin, M., Dufourcq, P., Blader, P., & Kelsh, R. N. (2006). A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons. *Development* 133, 4619–4630.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 919–930.
- Cermakian, N., & Sassone-Corsi, P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 59–67.
- Eglen, R. M., Bosse, R., & Reisine, T. (2007). Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5, 425–451.
- Elworthy, S., Lister, J. A., Carney, T. J., Raible, D. W., & Kelsh, R. N. (2003). Transcriptional regulation of mita accounts for the sox10 requirement in zebrafish melanophore development. *Development* 130, 2809–2818.
- Elworthy, S., Pinto, J. P., Pettifer, A., Cancela, M. L., & Kelsh, R. N. (2005). Phox2b function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent. *Mech Dev* 122, 659–669.
- Enquist, J., Skroder, C., Whistler, J. L., & Leeb-Lundberg, L. M. (2007). Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* 71, 494–507.
- Furuta, J., Nobeyama, Y., Umebayashi, Y., Otsuka, F., Kikuchi, K., & Ushijima, T. (2006). Silencing of peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. *Cancer Res* 66, 6080–6086.
- Goehler, H., Lalowski, M., Stelzl, U., Waelter, S., Stroedicke, M., Worm, U., Droege, A., Lindenberg, K. S., Knoblich, M., Haenig, C., Herbst, M., Suopanki, J., Scherzinger, E., Abraham, C., Bauer, B., Hasenbank, R., Fritzsche, A., Ludewig, A. H., Bussow, K., Coleman, S. H., Gutekunst, C. A., Landwehrmeyer, B. G., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (2004). A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell* 15, 853–865.
- Heese, K., Yamada, T., Akatsu, H., Yamamoto, T., Kosaka, K., Nagai, Y., & Sawada, T. (2004). Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem* 91, 1030–1042.
- Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., Lemort, N., Goossens, M., & Wegner, M. (1998). Mutation of the Sry-related Sox10 gene in dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5161–5165.
- Heydorn, A., Sondergaard, B. P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J., & Schwartz, T. W. (2004). A library of 77M receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem* 279, 54291–54303.
- Horn, S. C., Lalowski, M., Goehler, H., Droge, A., Wanker, E. E., & Stelzl, U. (2006). Huntingtin interacts with the receptor sorting family protein GASP2. *J Neural Transm* 113, 1081–1090.
- Huang, R., Xing, Z., Luan, Z., Wu, T., Wu, X., & Hu, G. (2003). A specific splicing variant of SVH, a novel human armadillo repeat protein, is up-regulated in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 63, 3775–3782.
- Irminger-Finger, I., & Jefford, C. E. (2006). Is there more to BARD1 than BRCA1? *Nat Rev Cancer* 6, 382–391.
- Ishikawa, K., Nagase, T., Nakajima, D., Seki, N., Ohira, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., & Ohara, O. (1997). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VIII. 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*. *DNA Res* 4, 307–313.
- Jacinto, F. V., Ballestar, E., Ropero, S., & Esteller, M. (2007). Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer Res* 67, 11481–11486.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., & Seuwen, K. (2006). The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem Med Chem* 1, 761–782.
- Kiyama, A., Isojima, Y., & Nagai, K. (2006). Role of Per1-interacting protein of the suprachiasmatic nucleus in NGF mediated neuronal survival. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 514–519.
- Krig, S. R., Jin, V. X., Bieda, M. C., O'Geen, H., Yaswen, P., Green, R., & Farnham, P. J. (2007). Identification of genes directly regulated by the oncogene ZNF217 using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip assays. *J Biol Chem* 282, 9703–9712.
- Kurochkin, I. V., Yonemitsu, N., Funahashi, S. I., & Nomura, H. (2001). ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 340–347.
- Lagerstrom, M. C., & Schioth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7, 339–357.
- Lefkowitz, R. J., & Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512–517.
- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J. H., Freissmuth, C., & Whistler, J. L. (2007). Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *FASEB J* 21, 802–811.
- Matsuki, T., Kiyama, A., Kawabuchi, M., Okada, M., & Nagai, K. (2001). A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer1. *Brain Res* 916, 1–10.
- Moran, L. B., & Graeber, M. B. (2008). Towards a pathway definition of Parkinson's disease: a complex disorder with links to cancer, diabetes and inflammation. *Neurogenetics* 9, 1–13.
- Mou, Z., Tapper, A. R., & Gardner, P. D. (2009). The armadillo repeat-containing protein, ARMCX3, physically and functionally interacts with the developmental regulatory factor Sox10. *J Biol Chem* 284, 13629–13640.
- Muramatsu, T. (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem* 132, 359–371.
- Nagase, T., Kikuno, R., Hattori, A., Kondo, Y., Okumura, K., & Ohara, O. (2000). Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes.XIX. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins *in vitro*. *DNA Res* 7, 347–355.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., & Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639–650.
- Rickman, D. S., Millon, R., De Reynies, A., Thomas, E., Wasyluk, C., Muller, D., Abecassis, J., & Wasyluk, B. (2008). Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 27, 6607–6622.
- Sakamoto, T., Uezu, A., Kawauchi, S., Kuramoto, T., Makino, K., Umeda, K., Araki, N., Baba, H., & Nakanishi, H. (2008). Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells* 13, 295–312.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J. J., Matifas, A., & Kieffer, B. L. (2004). Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem* 89, 766–775.
- Smith, C. A., McClive, P. J., & Sinclair, A. H. (2005). Temporal and spatial expression profile of the novel armadillo-related gene, Alex2, during testicular differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 233, 188–193.
- Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie, K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., Kuner, T., & Kuner, R. (2007). A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci* 27, 4165–4177.
- Thompson, D., Pusch, M., & Whistler, J. L. (2007). Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 282, 29178–29185.
- Whistler, J. L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S. R., & Von Zastrow, M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297, 615–620.
- Winter, E. E., & Ponting, C. P. (2005). Mammalian BEX, WEX and GASP genes: coding and non-coding chimaerism sustained by gene conversion events. *BMC Evol Biol* 5, 54.
- Zhou, X., Yang, G., Huang, R., Chen, X., & Hu, G. (2007). SVH-B interacts directly with p53 and suppresses the transcriptional activity of p53. *FEBS Lett* 581, 4943–4948.

I.2.5. Discussion: la publication n°1

Notre équipe a récemment publié un article dans lequel nous avons pu démontrer que le petit motif répété, présents 22 fois dans le domaine central de GASP-1, évoqué dans la publication N°1, est essentiel à l'interaction des GASP-1 à -5 avec plusieurs RCPG (Bornert *et al.*, 2013). Olivier Bornert (un étudiant en thèse du laboratoire) dans des expériences de « GST-pull down », de résonance plasmonique de surface et de co-immunoprécipitation réalisées avec différentes régions de la protéine GASP-1 a montré que la partie centrale de GASP-1 contenant les 22 motifs GASP est indispensable pour l'interaction avec différents récepteurs. Il a ensuite réalisé des expériences de mutagenèse dirigée ainsi que des expériences de compétition à l'aide de petits peptides synthétiques qui lui ont permis de montrer que le motif GASP et plus particulièrement la séquence hautement conservée SWFW au cœur de ce motif est essentielle pour l'interaction avec les RCPG.

Ce travail lui a permis par la suite de mettre au point un essai utilisable pour l'identification par criblage à haut débit de petites molécules permettant de bloquer l'interaction entre le récepteur bêta-2 adrénergique et GASP-1. Cette partie de son travail s'est située dans la continuité directe des travaux décrits dans ce manuscrit. Il a ainsi pu identifier très récemment les premières molécules capables de bloquer l'interaction GASP-1/bêta-2ADR. Elles sont actuellement en cours de caractérisation et une fois validées *in vitro*, elles pourront être testées dans le modèle d'hyperréactivité bronchique induit par les agonistes bêta-2 adrénergiques décrit ici.

I.3. La régulation négative des RCPG

Les récepteurs couplés aux protéines G sont, pour la plupart, rapidement internalisés après stimulation par leur ligand. L'étude de ce phénomène s'est particulièrement développée depuis une quinzaine d'années et a engendré une masse considérable d'informations. La vision des mécanismes et du rôle de l'internalisation des RCPG a grandement évolué, partant d'un simple rôle de régulation du niveau de récepteurs membranaires et de désensibilisation du signal jusqu'à l'apparition du concept récent de signaux de transduction émis spécifiquement par des RCPG internalisés. Suite à leur endocytose les récepteurs sont ensuite soit dégradés dans les lysosomes, c'est la régulation négative ou « down regulation », soit recyclés vers la membrane plasmique.

Pour de très nombreux RCPG l'orientation vers les lysosomes et la dégradation nécessite leur ubiquitinylation et leur interaction avec les domaines d'interaction à l'ubiquitine du complexe de tri vers les lysosomes (ESCRT). Cependant, tous les RCPG ne nécessitent pas une ubiquitinylation directe ou une interaction avec tous les composants de la machinerie ESCRT pour une dégradation dans les lysosomes. Les différents mécanismes de dégradation lysosomale des RCPG sont abordés dans les paragraphes suivants.

I.3.1. Ubiquitinylation et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G

Comme nous l'avons vu, l'ubiquitinylation prolongée de la β -arrestine n'est pas directement impliquée dans la dégradation lysosomale du récepteur β 2AR. Cependant, il a été observé qu'elle entraîne sa rétention au niveau de l'endosome, avec pour conséquence la potentialisation de son orientation vers la voie lysosomale. Il a été montré, en revanche, que l'ubiquitinylation du récepteur lui-même se trouve impliquée dans son orientation vers la voie lysosomale. L'ubiquitinylation de la β -arrestine mais également celle du récepteur β 2AR. L'ubiquitine ligase Mdm2 s'associe à la β -arrestine et catalyse alors l'ubiquitinylation de la β -arrestine, mais aussi l'ubiquitinylation du récepteur β 2AR, ce qui contribue à promouvoir sa dégradation lysosomale (Shenoy *et al.*, 2001). En effet, un récepteur β 2AR dont les résidus lysine de son domaine carboxyl-terminal ont été mutés afin d'empêcher toute ubiquitinylation est toujours internalisé mais n'est plus dégradé. Ceci indique que l'ubiquitinylation de β 2AR est nécessaire à sa dégradation mais pas à son internalisation et à sa séquestration au niveau de l'endosome. Le même type d'approche a été utilisé avec les récepteurs CXCR4 (Marchese & Benovic, 2001), PAR2 (Jacob *et al.*, 2005) et NK1 (Cottrell, 2006). Pour le récepteur CXCR4 une séquence de dégradation contenant les lysines ubiquitinylées a été caractérisée dans le domaine carboxyl-terminal (324SSLKILSKGK333). Ces récepteurs, dont les résidus lysine ont été mutés, sont internalisés mais ne sont plus dégradés suite à leur stimulation prolongée. Il a également été montré que le récepteur V2 est ubiquitinylé puis dégradé dans les lysosomes consécutivement à sa stimulation par la vasopressine. Cette ubiquitinylation nécessite la présence de la β -arrestine2 qui joue le rôle de protéine adaptatrice entre le récepteur V2 et le complexe d'ubiquitinylation (Martin *et al.*, 2003).

Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance des RCPG ubiquitinylés et leur orientation vers le compartiment lysosomal sont encore mal compris. Il a cependant été

proposé que le récepteur CXCR4 ubiquitinylé soit pris en charge par l'ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), un complexe protéique associé à la membrane de l'endosome qui est impliqué dans le transport de vésicules cargo ubiquitinylées vers le lysosome via un compartiment membranaire intermédiaire appelé corps multi-vésiculaire (MVB, *multivesicular body* ; Katzmann *et al.*, 2001). L'ESCRT est notamment composé de la protéine Hrs qui contient un domaine d'interaction avec l'ubiquitine. Des essais de déplétion de protéine Hrs ont montré un blocage du trafic vers le lysosome des récepteurs CXCR4 (Marchese *et al.*, 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine Hrs est également impliquée dans le recyclage vers la membrane cytoplasmique des récepteurs β 2AR et MOR (Hanyaloglu *et al.*, 2005) ce qui suggérerait qu'elle puisse jouer un rôle central dans le tri des récepteurs entre la voie de recyclage et la voie de dégradation lysosomale.

1.3.2 GASP-1 et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G

Comme nous l'avons vu dans la partie I.2.3, GASP-1 a été impliqué dans la dégradation des RCPG par la voie lysosomale. Cependant, cette voie ne semble pas nécessiter une ubiquitination directe des récepteurs ou une interaction avec Tsg101 (ESCRT-1) malgré sa dépendance avec HRS (ESCRT-0) et l'AAA-ATPase Vps4 qui est impliquée dans la régulation du complexe ESCRT (Tanowitz & Von Zastrow, 2002 ; Henry *et al.*, 2011).

Une étude très récente a rapporté une fonction surprenante d'une nouvelle protéine associée à l'autophagie, Beclin-2, dans la régulation du tri des RCPG vers le compartiment lysosomal et la dégradation par l'intermédiaire d'une interaction avec GASP-1 (He *et al.*, 2013). En particulier, dans des fibroblastes embryonnaires issus de souris KO Beclin-2 l'expression de différents RCPG semble plus élevée. Cependant de nombreuses questions restent à élucider et notamment comment Beclin-2 et GASP-1 recrutent les composants de la machinerie ESCRT pour finalement trier les récepteurs vers les lysosomes.

On peut noter ici que les résultats obtenus au laboratoire avec les KO GASP-1 ne sont pas en accord avec l'implication de GASP-1 dans la dégradation des RCPG mais à l'inverse dans leur recyclage. Ce point est évoqué dans la publication 1.

1.3.3 Alix et régulation négative des récepteurs couplés aux protéines G

ALIX est une protéine ubiquitaire qui couple les protéines associées à la membrane à la

machinerie ESCRT. Elle a trois domaines fonctionnels : un domaine NH₂-terminal Bro1, un domaine central de type V et une région COOH-terminal riche en proline qui se lie à d'autres protéines adaptatrices et aux ubiquitines ligases (Pires *et al.*, 2009 ; Sette *et al.*, 2010 ; Zhai *et al.*, 2008 ; Shi *et al.*, 2012). Si il a été montré qu'ALIX sert d'adaptateur à la machinerie ESCRT pendant la cytokinèse (Morita *et al.*, 2007) et facilite le bourgeonnement de virus enveloppés via une interaction avec la protéine MBV4 et le complexe ESCRT-III (Carlton *et al.*, 2008 ; Carlson *et al.*, 2012), son rôle dans le tri lysosomal des protéines internalisées demeure obscur.

Des découvertes récentes indiquent qu'ALIX serait impliqué dans le tri lysosomal de PAR1 (protease-activated receptor-1), un RCPG de la thrombin, via une voie non-canonique nécessitant ESCRT-III (Dores *et al.*, 2012). L'ubiquitination de PAR1 n'est pas nécessaire pour sa dégradation car ni HRS ni Tsg101 ne sont nécessaires pour la dégradation de PAR1 . Cette voie semble distincte de celle impliquant GASP-1 qui fait intervenir HRS et Vps4 mais pas Tsg101 (Tanowitz & Von Zastrow, 2002). Cependant, le fait que Vps4 et ESCRT-III soient essentiels pour la dégradation de PAR1, indique que certains composants sont conservés entre les voies de tri lysosomal régulées par GASP-1 et ALIX (Dores & Trejo, 2014).

I.4. L'asthme

L'asthme est une maladie très répandue affectant enfants et adultes. Annuellement, plus de 5000 personnes meurent de crise d'asthme aux USA, et cette maladie représente entre 1 et 3% de toutes les consultations. Ces chiffres pourraient être réduits par l'utilisation de traitements appropriés, mais la physiopathologie de l'asthme est connue depuis peu de temps seulement.

L'asthme est causé par l'inflammation chronique des voies respiratoires, ce qui rend les personnes asthmatiques hypersensibles à divers stimuli externes appelés allergènes. Quand l'inflammation est induite par un facteur externe ou interne, les voies aériennes enflent et se remplissent de mucus. Les muscles des voies respiratoires se contractent, causant d'autant plus de gêne. Cette difficulté à expirer exacerbe la crise d'asthme (Deepak *et al.*, 2006 ; Figure 13).

I.4.1. Types de médicaments

L'asthme ne peut être guéri, mais peut être contrôlé par différents types de médicaments :

-Les SABA (Short Acting B2-AR agonists), qui sont des agonistes des récepteurs bêta2 adrénergiques (B2-AR) qui induisent relaxation des muscles lisses des voies aériennes dont l'action est quasiimmédiate par inhalation et dure jusqu'à 6h au maximum

-Les LABA (Long Acting B2-AR agonists) dont l'action broncho-dilatatrice persiste plus de 12h après la prise.

-Les glucocorticoïdes réduisent l'inflammation aussi bien en modulant la production de cytokines et de chimiokines qu'en inhibant l'accumulation de basophiles, éosinophiles et de lymphocytes en réduisant la perméabilité vasculaire.

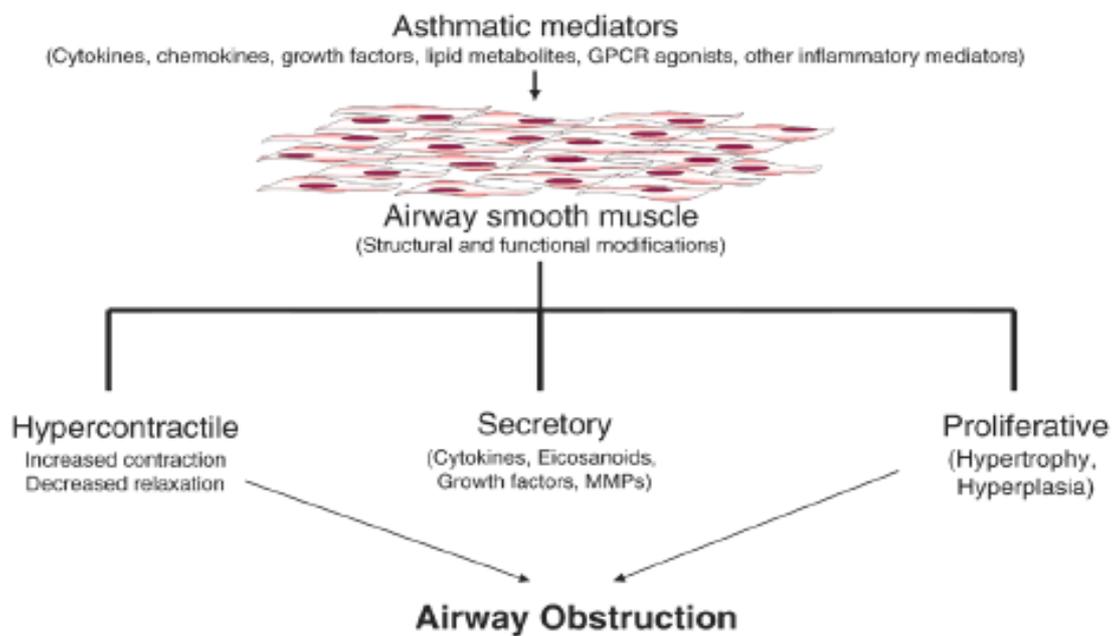


Figure 13 : Rôle du muscle lisse des voies aériennes dans la pathogenèse de l'asthme.

La stimulation du muscle lisse par les allergènes déclenche plusieurs mécanismes impliqués dans l'obstruction bronchique, ce qui exacerbe la crise d'asthme (January *et al.*, 1997).

1.4.2. Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont des RCPG localisés à la surface de la membrane des cellules innervées par des neurones adrénergiques (et certaines cellules non innervées). Ils ont pour fonction de lier les médiateurs adrénergiques endogènes : la noradrénaline et

l'adrénaline. Cette interaction déclenche une série d'événements intracellulaires complexes, qui provoquent des modifications spécifiques de l'activité de la cellule effectrice (Riviere & Papich, 2009).

I.4.2.1. Classification des récepteurs adrénérgiques

C'est sur les capacités relatives de la noradrénaline, de l'adrénaline et de l'isoprotérénol (un agoniste synthétique) à provoquer des effets excitateurs ou inhibiteurs sur une série de tissus (cœur, vaisseaux, poumons), qu'était fondée la toute première séparation des récepteurs adrénérgiques en deux principales classes : α et β (Riviere & Papich, 2009). Les réponses excitatrices étaient le plus souvent associées aux récepteurs α , et les réponses inhibitrices, aux récepteurs β . Les récepteurs cardiaques β excitateurs constituent l'exception principale de cette règle, et ont mené à la distinction de différents types de récepteurs β , nommés β_1 et β_2 (Riviere & Papich, 2009). Plus tard, les récepteurs α furent également séparés en sous-types α_1 et α_2 . Depuis, chaque type de récepteur a été partagé en de nombreuses sous-classes, aux profils pharmacodynamiques distincts.

I.4.2.2. Localisation des récepteurs adrénérgiques

De nombreux tissus contiennent à la fois des récepteurs α_1 et α_2 , ou β_1 et β_2 dans différentes proportions, qui varient notamment selon les espèces (Riviere & Papich, 2009). Le plus souvent, un sous-type domine, et confère au tissu ou organe sa classification fonctionnelle.

I.4.2.3. Les récepteurs de sous type α_1 et α_2

Il convient tout d'abord de préciser que les récepteurs α_1 et α_2 sont ceux qui se situent, en particulier, au niveau des fibres musculaires lisses des viscères et de l'endothélium des vaisseaux. Leur stimulation entraîne une contraction de ces fibres : on pense notamment aux problèmes de vasoconstriction des artérioles et des veines systémiques. Mais pour reprendre une ébauche de typologie à cet égard, nous dirons ici que les récepteurs α_1 sont ceux qui se

situent sur les cellules effectrices, et que sont appelées α_2 les récepteurs des terminaisons nerveuses. Les récepteurs α_1 sont donc ceux des vaisseaux innervés, tandis que les α_2 sont principalement localisés aux régions extra-synaptiques des fibres musculaires lisses vasculaires et à certains types de cellules non innervées (Riviere & Papich, 2009).

I.4.2.4. Les récepteurs β_1 cardiaques

Le récepteur fonctionnellement prédominant dans le myocarde des mammifères est de sous-type β_1 . Ce récepteur est activé, par ordre de puissance, par l'isoprotérénol, puis de manière équivalente par l'adrénaline et la noradrénaline (l'isoprotérénol est 10 à 20 fois plus actif sur le cœur que l'adrénaline et la noradrénaline). Le fait d'activer les récepteurs β_1 cardiaques conduit à une réponse caractéristique d'ordre sympathomimétique, avec des effets de diverses natures : inotropes, chronotropes, dromotropes, bathmotropes et tonotropes positifs. Une augmentation de la consommation en oxygène du myocarde et d'une vasodilatation coronarienne métabolique trouve son origine dans l'augmentation de la fréquence et de la contractilité cardiaques (Riviere & Papich, 2009).

I.4.2.5. Les récepteurs β_2 pulmonaires et des muscles lisses vasculaires

Les récepteurs β adrénergiques des poumons et de la vascularisation périphérique sont principalement de sous-type β_2 . (voir la structure du récepteur β_2 dans la figure 14). Ces récepteurs sont activés fortement par l'isoprotérénol et l'adrénaline, mais faiblement par la noradrénaline.

Les récepteurs β_2 pulmonaires provoquent une relaxation des muscles lisses bronchiolaires et par conséquent une bronchodilatation.

Les récepteurs β_2 des muscles lisses vasculaires sont présents dans différents tissus, où ils produisent une vasodilatation et réduisent la résistance vasculaire. Bien que cela soit encore incertain, il semblerait que la plupart des récepteurs β_2 vasculaires soient non innervés, et, comme pour les récepteurs β_2 pulmonaires, ils dépendraient principalement de l'adrénaline circulante pour l'activation et le tonus adrénergique basal.

Il est important de signaler que la classification α_1 - α_2 et β_1 - β_2 des récepteurs est une simplification à l'extrême, et qu'il existe de nombreuses divisions en sous-types (Rasmussen *et al.*, 2007). Il existe notamment des récepteurs β_3 .

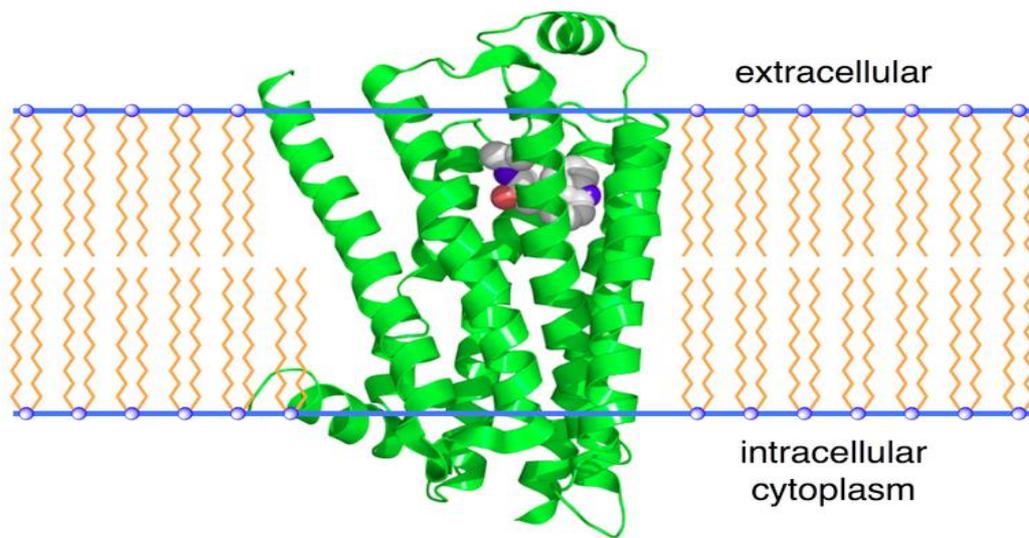


Figure 14 : Schéma de la structure cristallographique du récepteur β_2 -adrénérique

Structure cristallographique du récepteur β_2 -adrénérique (en vert) et de son agoniste inverse le carazolol (atomes de carbone en gris, d'oxygène en rouge et d'azote en bleu). La membrane phospholipidique est représentée sous forme de sphères bleues (phosphates) et des lignes jaunes (chaînes lipidiques). D'après (Rasmussen *et al.*, 2007).

I.4.2.6. Caractéristiques des différents types de récepteurs et de leurs agonistes

Tableau 1: Caractéristiques des principaux types de récepteurs adrénergiques, (Reiter, 2004).

Récepteurs	Localisations majoritaires	Effet prédominant	Agoniste prédominant
Récepteurs β_1	Cardiaque, Post-synaptique	Augmentation de fréquence cardiaque et de contractilité	Noradrénaline = Adrénaline
Récepteurs β_2	Vascularisation périphérique, Bronches, Extra et présynaptique	Vasodilatation, Bronchodilatation	Adrénaline
Récepteurs α_1	Post-synaptique	Vasoconstriction	Noradrénaline
Récepteurs α_2	Extra et présynaptique	Vasoconstriction	Adrénaline

L'adrénaline est un puissant stimulant α , et est également très active sur les récepteurs β (tableau 1). Elle provoque donc à la fois une vasodilatation dans les vaisseaux contenant des récepteurs β_2 (ex : muscles squelettiques), et une vasoconstriction dans les vaisseaux où les récepteurs α sont prédominants (ex : viscères abdominaux). Le flux sanguin est donc augmenté dans certaines régions en réponse à la vasodilatation, et diminué dans les zones où la vasoconstriction prédomine.

L'isoprotérénol est un agoniste β sélectif. Il provoque une vasodilatation, une chute de la pression artérielle diastolique, une baisse des résistances périphériques, et une augmentation du flux sanguin dans les zones contenant des récepteurs β .

Le cœur est activé par l'adrénaline, la noradrénaline, et l'isoprotérénol. L'isoprotérénol est le plus puissant des trois, et provoque une augmentation importante de la force contractile du myocarde, de la fréquence cardiaque, et du débit cardiaque.

La noradrénaline augmente aussi la force contractile du myocarde, mais provoque une bradycardie à son pic d'effet, du fait d'une augmentation du tonus vagal. De plus, la vasoconstriction périphérique induite par la noradrénaline est susceptible de diminuer le retour veineux, limitant ainsi l'augmentation du débit cardiaque, malgré l'activation du cœur. La noradrénaline a une affinité plus grande pour les récepteurs β_1 que pour les β_2 ; l'adrénaline a approximativement la même affinité pour les deux types de récepteurs (Reiter, 2004 ;Figure 15).

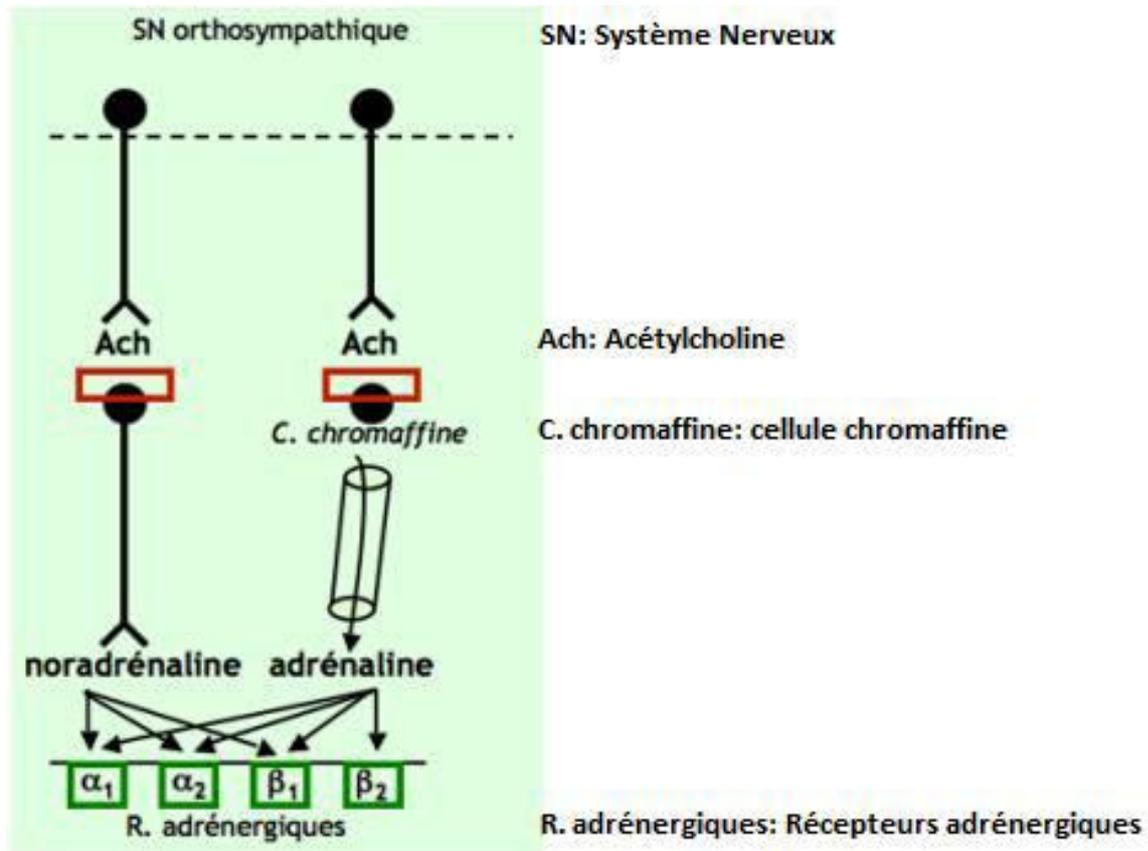


Figure 15 : Organisation périphérique schématique du système orthosympathique (Pilot-Storck, 2011)

I.4.2.7. Conséquences de l'activation des récepteurs bêta-adrénergiques

Les récepteurs β -adrénergiques sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à l'adénylcyclase par une protéine G (Figure 16). Leur stimulation induit la formation d'AMP cyclique (à partir d'ATP), second messenger qui engendre ses effets par une cascade d'activation.

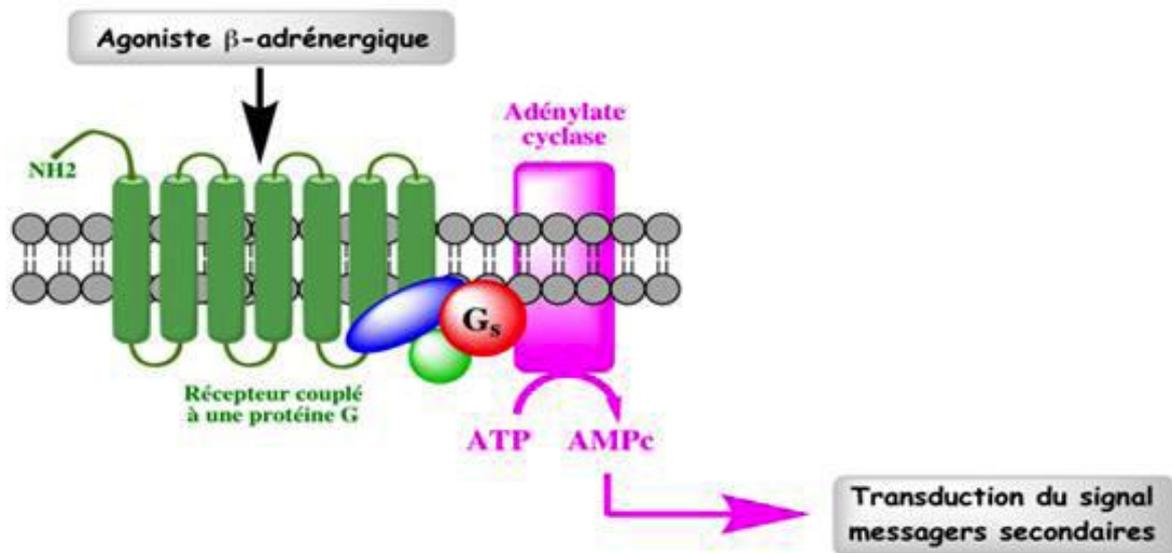


Figure 16 : Schéma de la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G (Deepak *et al.*, 2006)

I.4.3. Récepteurs β-adrénergiques et traitement de l'asthme

En ce qui concerne le traitement de l'asthme, le récepteur β_2 , qui est activé par la liaison d'un agoniste spécifique, constitue la cible thérapeutique privilégiée. Sa structure tridimensionnelle cristallographique a d'ailleurs fait l'objet d'une publication récente (Reiter, 2004). Induit par cette liaison, le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP, et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) intracellulaires qui vont aller réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques.

Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par du GTP continue. L'AMPc catalyse l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle des protéines induisant la relaxation du muscle lisse. L'AMPc inhibe également la sortie de calcium Ca^{2+} des réserves cytoplasmiques, favorisant ainsi la localisation du Ca^{2+} dans ces vésicules plutôt que dans le cytoplasme. D'autres mécanismes favoriseraient la relaxation du muscle lisse, via l'interaction avec les canaux potassiques par exemple (Figure 17).

Parmi les traitements privilégiés de l'asthme figure l'application d'agonistes β_2 -AR. Toutefois, il convient de souligner que l'utilisation répétitive des agonistes β_2 -AR entraîne, à

long terme, une hyperréactivité bronchique. Ainsi en effet, des souris soumises à un traitement chronique au salbutamol, agoniste β_2 -AR, ont développé une hyperréactivité à la métacholine (agoniste muscarinique provoquant une bronchoconstriction). Ce phénomène s'accompagne d'un remodelage du muscle lisse des voies aériennes, dont un épaississement du muscle lisse trachéal. Il a été proposé que ce phénomène soit lié à la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein) (Tamaoki *et al.*, 2004).

L'application d'agonistes β_2 -AR de façon chronique entraîne également une tolérance aux effets de ces médicaments, les rendant par là même inefficaces, aggravant la maladie et augmentant la morbidité et la mortalité de l'asthme (Finney *et al.*, 2000).

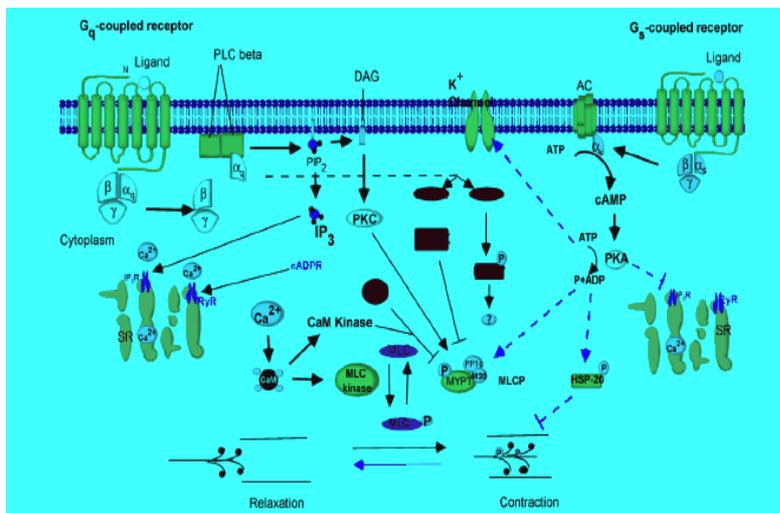


Figure 17 : Implication de la voie de signalisation du récepteur β_2 -AR dans la relaxation du muscle lisse bronchique.

La stimulation du récepteur β_2 -AR (représenté à droite dans la Figure 17, G_s -coupled receptor) induit la stimulation de divers acteurs de la relaxation musculaire. Par exemple, via la sous-unité alpha de la protéine G auquel il est couplé, la stimulation du récepteur β_2 -AR induit l'activation de l'AMPc qui catalyse l'activation protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle à son tour des protéines induisant la relaxation du muscle lisse (Deepak *et al.*, 2006).

II. OBJECTIFS DE LA THESE

Le traitement de l'asthme avec un agoniste β 2-AR entraîne à long terme une exacerbation des symptômes de l'asthme et une hyperréactivité des voies aériennes. Étant donné l'importance potentielle de GASP-1 dans la modulation de l'activité des récepteurs β 2-AR, nous avons voulu examiner l'implication de GASP-1 dans ce phénomène. Par ailleurs, la tolérance aux agonistes β 2-AR serait d'après notre hypothèse étroitement liée à une diminution du nombre de sites à la surface des cellules. Nous cherchons à établir un lien entre la diminution du nombre de sites à la surface des cellules et la dégradation des RCPG dont GASP-1 serait un des protagonistes.

L'objectif principal de ce travail a été d'examiner en détail l'interaction de GASP-1 et du récepteur β 2-AR dans le contexte des voies aériennes. Le rôle de GASP-1 dans l'hyperréactivité à la méthacholine induite par un traitement prolongé avec les agonistes bêta2-adrénergiques a été étudié *in vivo* grâce à l'utilisation de souris KOGASP-1. De plus, nous avons tenté de développer un modèle cellulaire permettant d'étudier le rôle de GASP-1 dans la signalisation associée aux récepteurs bêta2-adrénergiques du muscle lisse bronchique. Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire du Dr Frédéric Simonin (UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, ESBS, Illkirch) en collaboration avec le Dr Nelly Frossard (UMR 72200, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Illkirch).

III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Origine des produits utilisés

Les produits suivants, Alprénolol hydrochloride, ICI 118 551, CGP 20 712 A, épinephrine hydrochloride, isoprotérenol et formotérol ont été commandé chez Sigma Aldrich. Le radioligand CGP 12 177 a été commandé chez Perkin Elmer. L'anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de GASP-1 a été réalisé à la plate forme « Anticorps » à l'IGBMC. Il a ensuite été purifié par affinité grâce a une résine sur laquelle, la partie de la protéine qui a servi à l'immunisation a été fixée.

III.2. Animaux

Nos travaux ont été réalisés sur des souris mâles adultes (WT+KO GASP1) de fond génétique mixte (50% C57BL/6J /50% SV129) générées à l'institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch). Les souris ont 8-12 semaines au début du protocole, et pèsent entre 26 g et 30 g. Les animaux sont habitués aux conditions d'hébergement et sont répartis en groupes de 4 souris par cage. L'éclairage est programmé selon un cycle lumière/obscurité de 12h (allumé de 7h à 19h) et la température ambiante de la pièce est de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Toutes les souris disposent d'eau et de nourriture *ad libitum*, et les expériences sont réalisées durant la phase éclairée du cycle. Toutes les procédures expérimentales sont conformes aux directives européennes pour le soin des animaux de laboratoire (86/609/ECC).

III.3. Génération des souris KO GASP-1

Le gène codant pour GASP-1 est constitué de 12 exons. Les 11 premiers exons sont noncodants alors que le douzième exon code pour GASP-1 dans sa totalité. Les souris déficientes en GASP-1 ont été obtenues en supprimant les exons 6 à 12 à l'aide de la technique de recombinaison homologue. Pour cela un vecteur de criblage a été réalisé, il contient un gène de résistance à la néomycine bordé par deux bras d'homologie 5' et 3' correspondant aux séquences situées en amont et en aval des exons 6 à 12 qui seront supprimés. Ces bras d'homologie ont été amplifiés par PCR sur de l'ADN génomique de cellule souche embryonnaire (ES) de souris 129S2/SvPas. Le vecteur linéarisé a été transféré

par électroporation dans des cellules ES de souris 129S2/SvPas cultivées en présence de néomycine afin de sélectionner les cellules ayant intégré le gène de résistance à cet antibiotique. Les clones résistants ont été analysés par PCR et un clone positif a pu être identifié. Il a été ensuite confirmé par Southern Blot avec une sonde néomycine sur des digestions avec des enzymes de restriction pour lesquelles un site est présent à l'intérieur de la zone d'homologie et un site est à l'extérieur. Un clone de cellule ES positif a été transféré par micro-injection à l'intérieur d'un embryon de souris C57BL/6J au stade blastocyste implanté dans une mère porteuse. La descendance chimérique (129S2/SvPas-C57BL/6J) ainsi obtenue a été mise en reproduction avec des souris C57BL/6J (Bœuf *et al.*, 2009). Cette lignée est constituée d'animaux fertiles et au développement normal.

III. 4. Méthodes de mesure de la réactivité bronchique

III.4.1. Technique de l'oscillation forcée

La réactivité bronchique à la méthacholine (agoniste muscarinique à effet bronchoconstricteur) a été évaluée en utilisant le flexivent (voir Figures 18 et 19). Les souris ont été anesthésiées avec une injection intra-péritonéale de xylazine (Rompun, 1mg/kg), suivi 15 minutes plus tard par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (3.64 mg/kg). La trachée est exposée et une aiguille métallique de calibre 18 a été insérée dans la trachée (voir Figure 19). Les voies aériennes ont été reliées à un petit ventilateur quasi-sinusoïdale contrôlé par ordinateur. Les trachées sont ventilées avec un volume courant de 10 ml/kg à une fréquence de 150 cycles / min et une pression expiratoire positive de 2 cm d'H₂O ce qui permet aux poumons d'atteindre un volume moyen proche de celui atteint lors de la respiration spontanée. Après la mesure d'un niveau de référence, chaque souris a été testée pendant 10s avec un aérosol de solvant généré avec un nébuliseur en ligne et administrée directement par le ventilateur avant le PBS et la méthacholine à 50 mg/ml. Pour le calcul de l'effet de la méthacholine, la réponse maximale a été utilisée comme la moyenne des trois valeurs maximales et intégré pour le calcul de la résistance des voies aériennes (R). Cette résistance est exprimée en cm H₂O.s.ml⁻¹ (Daubeuf *et al.*, 2013b).

III.4.2. Technique de la pléthysmographie

La réactivité des voies respiratoires à des concentrations croissantes de métacholine (0 à 0,3 M) a été mesurée chez des animaux conscients et respirant spontanément sans retenue à l'aide d'un pléthysmographe barométrique (Emka Technologies ; voir Figure 20), en utilisant la pause augmentée (Penh ; voir Figure 21) comme un indice d'obstruction des voies respiratoires comme décrit précédemment (Delayre-Orthez *et al.*, 2004 ; Daubeuf *et al.*, 2013a). Brièvement, les souris ont été stabilisées dans la chambre du pléthysmographe pendant 30 min jusqu'à ce que la ligne de base soit stable, puis ont été exposées à la solution saline en aérosol (30 sec) comme témoin. Ensuite, les souris ont été testées toutes les 20 minutes avec des doses croissantes de métacholine en aérosol pendant 30 sec. chacune, et la réactivité des voies respiratoires a été enregistrée pendant 5 min.



Figure 18 : Flexivent® : méthode d'oscillation forcée de la mesure de la fonction pulmonaire. Photographie du dispositif expérimental utilisé dans notre étude

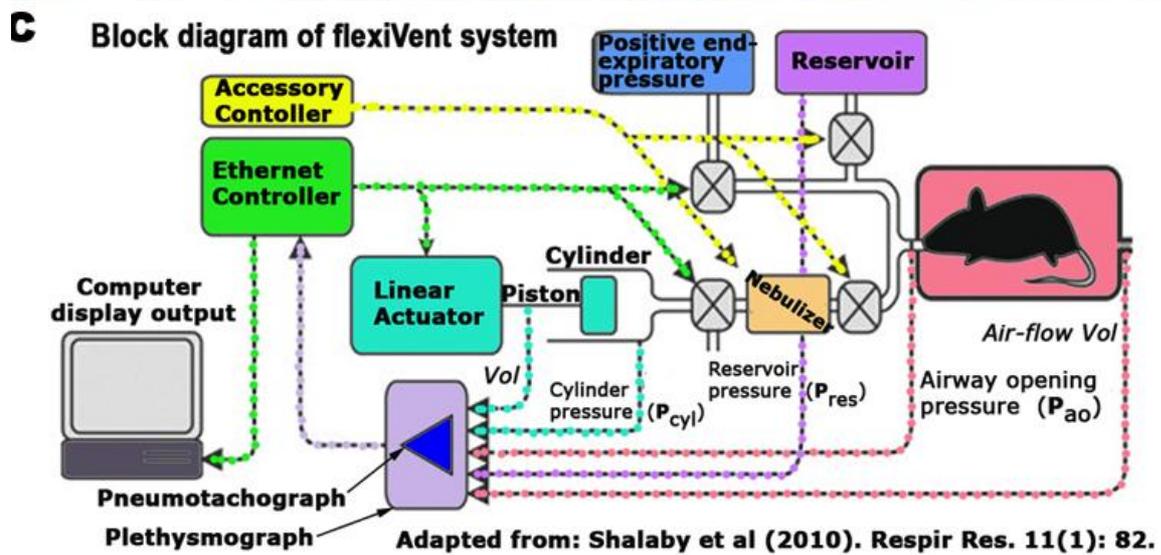


Figure 19 : Flexivent® :méthodes d'oscillation forcée de la mesure de la fonction pulmonaire. Photographies (A et B) et schéma (C) du dispositif expérimental utilisé dans notre étude.



Figure 20 : photographie des chambres du pléthysmographe.

Une pompe assure un flux continu et constant d'air frais (1). Un capteur à 2 voies permet la détection du flux d'air inspiré et du flux d'air expiré par la souris (2). Enfin, une entrée est prévue pour la nébulisation de produits pharmacologiques (3). (www.emka-technologies.com)

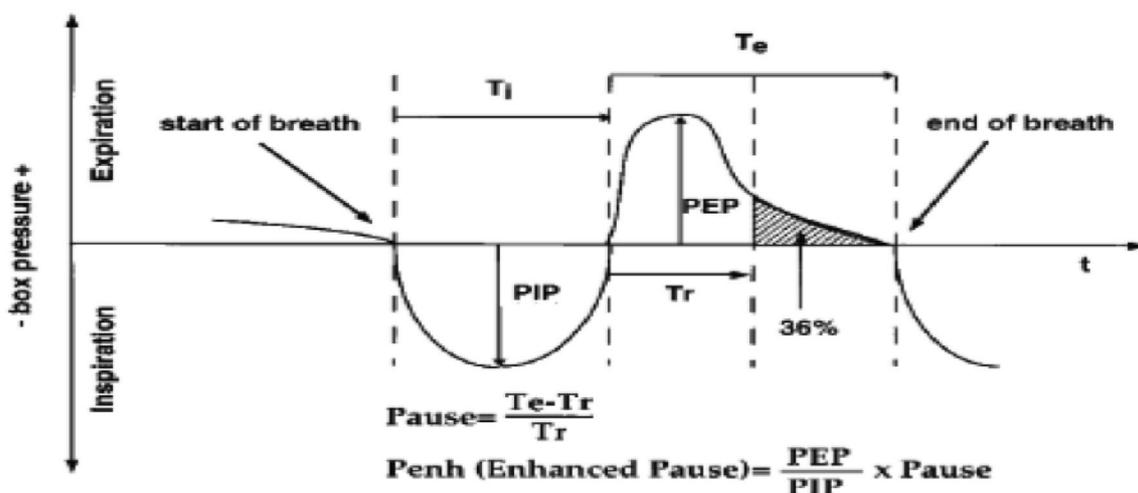


Figure 21: représentation schématique des paramètres pris en compte par l'index Penh

Le Penh prend en compte les intensités d'expiration, d'inspiration, ainsi que leurs temps respectifs ; il permet donc une bonne appréciation de la difficulté respiratoire.

III.5. Protocoles des expérimentations animales

III.5.1. Administration des agonistes bêta2-adrénergiques

Le formotérol (Sigma, F9552) et le salbutamol (Sigma, S8260) ou le solvant (2-hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine, CDx, 1,25% et 10% dans le sérum physiologique, respectivement) ont été administrés par voie intranasale (i.n.) aux doses de 40 et 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour le formotérol et 1 mg/kg pour le salbutamol. Les administrations intranasales ont été réalisées sous anesthésie légère (50 mg/kg de kétamine et 3.33 mg/kg de xylazine par voie intrapéritonéale).

III.5.2. Effet aigu d'une seule dose de salbutamol sur la réactivité bronchique chez les souris sauvages.

Le but de cette expérience est de tester l'effet d'une seule dose de salbutamol (agoniste β_2 adrénergique) sur la réactivité bronchique à la métacholine chez des animaux sauvages de

même fond génétique que les souris KOGASP1 (50% C57BL6J/50%SV129) en utilisant le flexivent.

Le protocole consiste à anesthésier les souris par deux administrations intrapéritonéales, une première de xylazine, pour décontracter les muscles, suivie d'une seconde de pentobarbital, un anesthésique dissociatif. Le salbutamol est administré par voie intranasale entre les deux administrations IP (voir schéma 1). La souris est alors placée en *decubitus dorsal*, une trachéotomie est réalisée en introduisant un canal qui lie la trachée au flexivent. La respiration est ainsi assistée et imposée par l'appareil. Une solution de PBS est d'abord nébulisée pour donner le niveau basal suivie par la nébulisation par la métacholine qui donne le maximum de broncho-constriction

La mesure de la réactivité bronchique est effectuée 12 fois après chaque nébulisation. La mesure est effectuée en comparant le flux en amont et en aval de l'animal via une perturbation du flux.

Schéma 1: Protocole d'anesthésie et d'administration du salbutamol et de la métacholine.

MCH: métacholine

Cette expérience a été réalisée sur des souris sauvages de fond génétique 50% C57BL6J/50%SV129. Les animaux testés sont au nombre de 8 souris réparties en 2 groupes :

- Groupe 1 : PBS-PBS (4 souris)
- Groupe 2 : PBS-MCH (4 souris)

III.5.3. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages

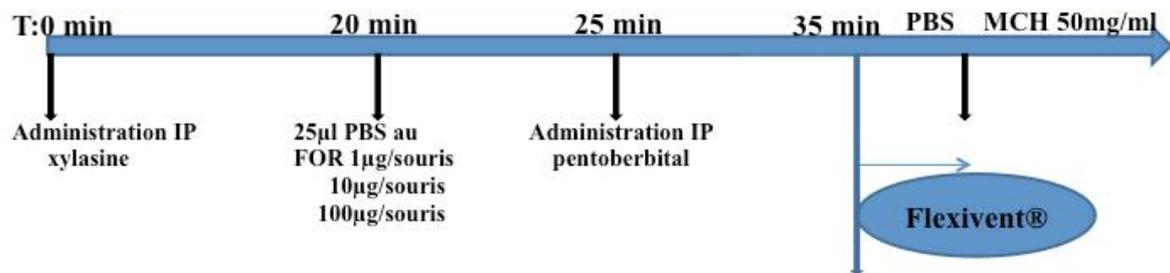
Le but de cette étude est de tester trois doses de formotérol (agoniste β_2 adrénergique) afin d'identifier la dose optimale qui permet de prévenir au maximum la bronchoconstriction induite par la métacholine en utilisant le Flexivent.

Le protocole d'anesthésie, d'administration des doses de formotérol ainsi que la mesure de la réactivité bronchique est identique au protocole précédent (voir schéma 2). Trois doses de formotérol 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et 1 mg/kg (par poids de l'animal) ont été testées. Cette expérience a été réalisée sur des souris sauvages de même fond génétique que les souris

KOGASP1 (50% C57BL6J/50%SV129). Les animaux testés sont au nombre de 32 souris réparties en quatre groupes :

- Groupe 1 :PBS-PBS (8 souris)
- Groupe 2 :FOR 40 μ g/kg –MCH (8 souris)
- Groupe 3 :FOR 400 μ g/kg-MCH (8souris)
- Groupe 4 : FOR 1 mg/kg-MCH (8souris)

Schéma 2: Protocole d'anesthésie et d'administration du formotérol et de la métacholine



III.5.4. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique des souris KO GASP1

Le but de cette expérience est de tester l'effet aigu d'une dose de formotérol (FOR), 400 μ g/kg chez les souris KO GASP1.

Le protocole d'anesthésie, d'administration de formotérol ainsi que la mesure de la réactivité bronchique est identique au protocole précédent. Les animaux utilisés sont au nombre de 32 souris réparties en 4 groupes :

- Groupe 1 : WT/PBS, (8souris)
- Groupe 2 : KOGASP1/PBS (8 souris)
- Groupe 3 : WT/FOR (8souris)
- Groupe 4 : KO GASP1/FOR (8 souris)

III.5.5. Préparation des membranes à partir depoumons et quantification du nombre de sites bêta-adrénergiques par liaison à un ligand radioactif.

Pour la préparation des membranes, un demi poumon est pesé, puis broyé à

l'ultraturax dans 10ml de tampon 5 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 2 mM EDTA avec inhibiteurs de protéases (Roche, complete). L'extrait est ensuite centrifugé 15 min à 4°C à 35 000 g. Le culot est lavé avec le tampon de broyage puis centrifugé une nouvelle fois 15 min à 4°C à 35 000 g. Il est ensuite resuspendu dans 2ml de tampon 75 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 12,5 mM MgCl₂; 2mM EDTA, puis homogénéisé à l'aide d'un potter. La quantité de protéine est dosée par la méthode de Bradford par référence à une gamme croissante de BSA avec un réactif Bio Rad.

Les essais de binding sont réalisés en duplicats dans des tubes Minisorb™ (Nunc) dans du tampon 50mM Tris-HCl pH 7,7 (volume final de 500µl), en présence d'une concentration saturante d'un ligand radioactif bêta-AR non sélectif, le [³H]CGP-12177 à 2nM (50µl), et avec 50µg de protéines. La distinction entre récepteurs bêta-1 et bêta2-AR se fait par addition dans 2 duplicats supplémentaires respectivement de 500nM d'antagoniste bêta2-AR ICI 118 551 et 2µM bêta1-AR CGP-20712A (50µl de chaque antagoniste). La liaison non spécifique est mesurée à l'aide d'un antagoniste non sélectif, l'alprénolol, à 2µM (50µl). Les tubes sont mis à incubés pendant 30 min au bain marie à 37°C. L'excès de radioligand non lié est éliminé par filtration sur un filtre Whatman de type GF/B à l'aide d'un appareil de filtration rapide (Brandel©). La radioactivité retenue sur les filtres est comptée en présence de 3ml d'un liquide scintillant (Ultimate gold, PerkinElmer) à l'aide d'un compteur à scintillation (PerkinElmer).

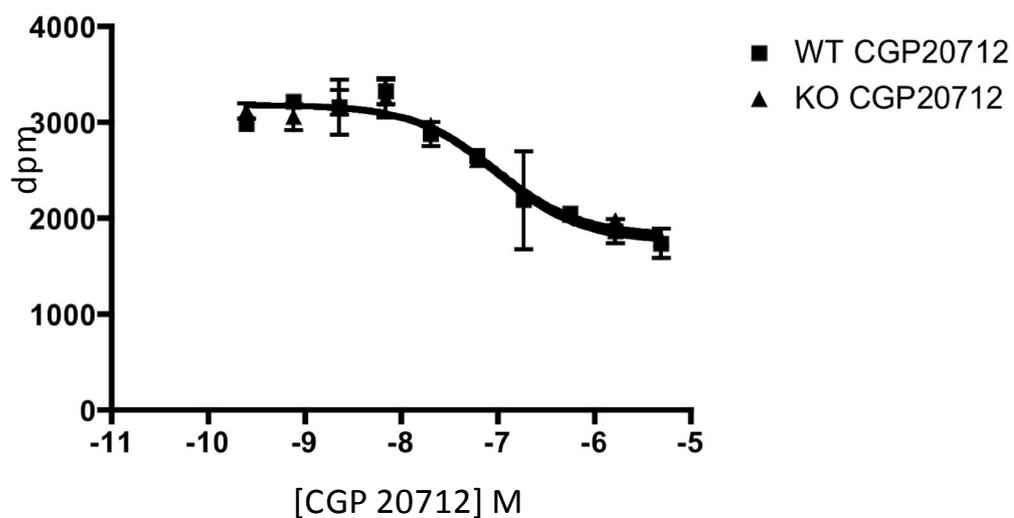
III.5.6. Effet aigu du formotérol sur le nombre des récepteurs bêta-adrénergiques

Le but de cette expérience est d'évaluer l'influence d'un traitement aigu au formotérol sur le nombre de sites de récepteurs bêta1- (B1) et bêta2-(B2) adrénergiques dans des homogénats de poumons des souris sauvages et des souris KO GASP1.

Nous avons préparé des membranes à partir d'un poumon de chaque animal utilisé lors de nos expériences de bronchodilatation et le nombre de sites B1-AR et B2-AR ont été déterminé individuellement pour chaque animal par la technique décrite au paragraphe précédent (III.5.5). Dans les membranes des animaux contrôle saline, nous avons pu déterminer qu'environ 70% de la liaison spécifique totale mesurée avec le [³H]CGP-12177 est due au récepteur B2-AR, le reste étant dû au récepteur B1-AR (données non montrées). Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Nous avons par ailleurs vérifié que les valeurs de K_d obtenues pour le [³H]CGP-12177 sont similaires pour les

membranes de poumon des souris contrôles WT et KO GASP-1 (respectivement 0.17 ± 0.3 nM et 0.21 ± 0.4 nM). Ces valeurs sont proches de celles décrites dans la littérature. C'est également le cas des valeurs de K_i obtenues pour les ligands froids CGP-20712A (Figure 22A ; tableau 2) et ICI 118 551 (Figure 22B ; tableau 2)

A



B

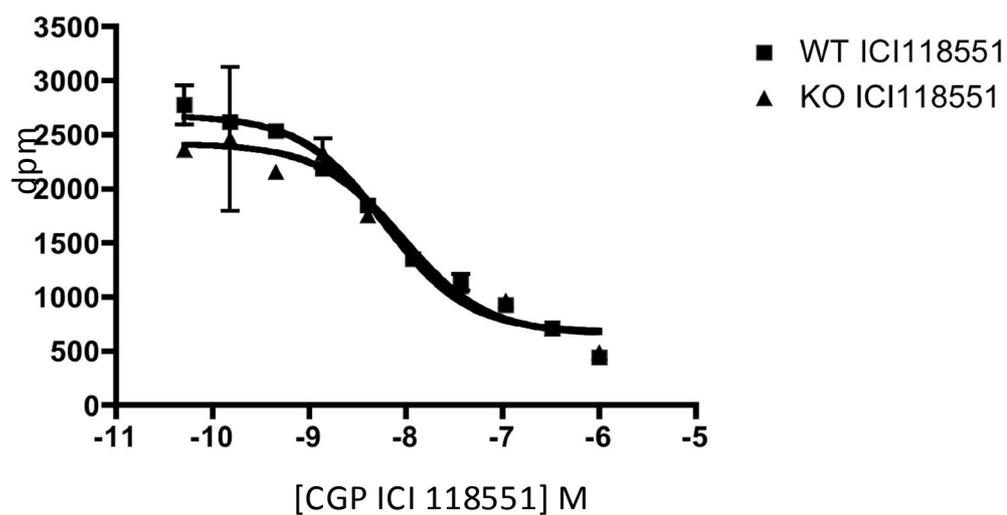


Figure 22 : Détermination des valeurs de K_i pour lessouris contrôles saline WT et KO GASP1

Gamme de CGP20712(A) et de ICI 118551(B). Chaque point est réalisé en duplicat et les poumons de 5 souris contrôles saline WT et KO GASP-1 ont été traités individuellement

Tableau 2 : Moyennes des valeurs de K_i pour les ligands CGP 20712 et ICI 118551 Valeurs obtenues pour les souris contrôles saline WT et KO GASP1

Ligand	WT CGP20712	KO CGP20712	WT ICI118551	KO ICI118551
Ki	18 ± 7 nM	9 ± 2 nM	$0,78 \pm 0.06$ nM	$1,05 \pm 0.05$ nM

III.5.7. Effet chronique du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris WT et KO GASPI

Le but de cette expérience est d'analyser l'hyperactivité bronchique des souris WT et KO GASPI à la métacholine après un traitement chronique au formotérol à l'aide du pléthysmographe barométrique et du flexivent.

Le protocole consiste à traiter les souris quotidiennement avec le formotérol 400 µg/kg

Nous avons utilisé 36 souris divisées en 4 groupes :

- Groupe 1 : WT-PBS (9 souris)
- Groupe 2 : KO-PBS (9 souris)
- Groupe 3 : WT-FORMO (9 souris)
- Groupe 4 : KO-FORMO (9 souris)

Au 28^{ème} jour après traitement, la réactivité des voies respiratoires à des concentrations croissantes de métacholine (0 à 0,3 M) a été mesurée chez des animaux conscients et respirant spontanément sans retenue par pléthysmographie (voir Figure 20) barométrique (Emka Technologies), en utilisant la pause améliorée (Penh : enhanced pause ; voir III.4.2.) comme un indice d'obstruction des voies respiratoires comme décrit précédemment (Delayre-Orthez *et al.*, 2004). Brièvement, les souris ont été stabilisées dans la chambre du pléthysmographe pendant 30 min jusqu'à ce que la ligne de base soit stable, puis exposées à la solution saline en aérosol (30 sec) comme témoin. Ensuite, les souris ont été testées toutes les 20 minutes avec des aérosols contenant les doses croissantes de métacholine (30 sec chacun), et la réactivité des voies respiratoires a été enregistrée pendant 5 min.

Au 35^{ème} jour, la réactivité bronchique a été évaluée 24 heures après la dernière administration de formotérol avec la technique d'oscillation forcée au flexivent (voir III.4.1.).

III.5.8. Mesure de la tolérance induite par administration chronique de formotérol

Il s'agit de mesurer la résistance des voies respiratoires par la technique de l'oscillation forcée juste après administration de formotérol afin de tester la tolérance induite par administration chronique de formotérol.

La réactivité bronchique à la méthacholine a été évaluée en utilisant la technique d'oscillation forcée par le flexivent en utilisant le même protocole que celui décrit précédemment (voir III.4.1a).

Nous avons utilisé 48 souris divisées en 6 groupes

- Groupe 1 : WT-PBS-PBS (8 souris)
- Groupe 2 : KO-PBS-PBS (8 souris)
- Groupe 3 : WT-PBS-FORMO (8 souris)
- Groupe 4 : KO-PBS-FPRMO (8 souris)
- Groupe 5 : WT-FPRMO-FORMO (8 souris)
- Groupe 6 : KO-FORMO-FORMO (8 souris)

III.5.9. Effet chronique du formotérol sur le nombre des récepteurs bêta-adrénergiques

L'objectif de cette expérience est la quantification du nombre de sites des récepteurs B1- et B2-AR dans des homogénats de poumons des souris KO GASP1 après un traitement répété au formotérol.

Le protocole suivi est identique à celui précédemment décrit pour évaluer le nombre de ces récepteurs après un traitement aigu au formotérol (III.5.5, III.5.6).

III.5.10. Mesure du collagène et de l'activité de la Myeloperoxydase dans le poumon

Le but de cette expérience est de mesurer dans les poumons des souris WT et KO GASP-1 le collagène, qui constitue une composante du remodelage bronchique, et l'activité de la Myeloperoxydase (MPO) qui sert d'indicateur d'inflammation.

Après prélèvement, les lobes droit du poumon ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'à utilisation. Les protéines du poumon ont été extraites dans 500 µl de PBS à l'aide d'un ultraturax (IMLAB, Lille, France) et centrifugées (10,000g, 10 min, 4°C). Le surnageant a été récupéré et utilisé pour mesurer le collagène et l'activité MPO.

La mesure du collagène dans les poumons a été réalisée par un dosage colorimétrique : à 10 µl d'échantillon sont ajoutés 200 µl de réactif colorant du collagène (Sirius red 0.017%, et acide picrique 0.8% dans l'éthanol absolu). Le mélange est passé 30 min au vortex (200 rpm) à température ambiante. Ensuite, le mélange est centrifugé à 2400g pendant 20 min à 4°C et le

surnageant est éliminé. Le culot est solubilisé par 200µl avec le réactif de collagène Alkali (éthanol absolu 20%, sodium dodécyl sulfate 1.3%, 2N hydroxide de sodium 12%) et la densité optique est mesurée à 540 nm.

L'activité MPO du poumon a été utilisée comme une mesure indirecte de l'infiltration des neutrophiles dans les tissus. Pour cette mesure, du bromure d'ammonium hexadécyltriméthyl (HTAB) et de l'EDTA ont été ajoutés à 200µl de surnageant à une concentration finale de 0,5% HTAB et EDTA 5 mM dans du PBS. 15 µl du mélange ont été placés dans des tubes à essai avec 200 µl d'un tampon contenant 0,03% d'H₂O₂, 0,5 mM de chlorhydrate o-dianisidine et 50 mM KH₂PO₄ (pH 6,15). La variation d'absorbance a été mesurée à 450 nm.

III.5.11. Mesure de l'alpha actine du muscle lisse dans le poumon

L'alpha l'actine a été mesurée par ELISA dans le surnageant après extraction des protéines du poumon comme décrit ci-dessus (III.5.10). Les Surnageants ont été déposés dans une plaque 96 puits (Nunc MaxiSorp®, 456537) dans 0,1M de tampon de carbonate de sodium pH 9,5 et la plaque a été incubée pendant une nuit à 4°C. La plaque a été lavée 3 fois avec un laveur de microplaques automatisé (Wellwash, Labsystems) avec 300 µl de tampon de lavage (PBS, 0,05% de Tween 20). La détection non spécifique a été bloquée par addition de 300 µl de tampon de blocage (PBS, BSA 10%) et la plaque a été incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. La plaque a été lavée 3 fois (PBS, 0,05% de Tween 20) et 100 µl d'anticorps anti-actine musculaire lisse alpha (Abcam, ab5694), dilué dans le tampon bloquant, a été ajouté à chaque puits. La plaque est incubée pendant 2 heures à température ambiante sous agitation. Ensuite, elle a été lavée 3 fois avec 300 µl tampon de lavage. La Streptavidine-HRP (Sigma, E-2886), dilué dans le tampon bloquant, a été ajouté à chaque puits. La plaque a été incubée pendant 20 minutes à température ambiante sous agitation et lavée 3 fois avec 300 µl de tampon de lavage. 100 µl de réactif de substrat TMB (BD Pharmingen, 555214) a été ajouté à chaque puits et la plaque a été incubée pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée avec 50 µl de solution d'acide sulfurique 2N. La densité optique de chaque puits a été déterminée immédiatement, en utilisant un lecteur de microplaques (ELISA VersaMax lecteur de microplaques, Molecular Devices) réglé à 450 nm de longueur d'onde et corrigée à 570 nm (pour les imperfections sur la surface de la plaque). La densité optique mesurée est corrélée avec la quantité d'alpha actine musculaire lisse présente dans le surnageant.

III.5.12. Observation histologique et mesure de l'épaisseur du muscle lisse bronchique

La moitié supérieure des poumons gauche a été fixée (4 % de formaldéhyde) et incluse en paraffine. Des sections de six μm ont été coupées et montées sur des lames Superfrost (Fisher Scientific), puis colorées avec l'Haematoxyline-Eosine ou le colorant trichrome de Masson pour visualiser le collagène.

Le Muscle lisse a été identifié par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre l'alpha-actine musculaire lisse et les cellules ont été révélés en fluorescence avec le DAPI. Des sections de trois μm ont été coupées et montées sur des lames Superfrost+. Les lames ont été placées dans un système Sequenza pour immunomarquage avec couvercle (Shandon) et la récupération de l'antigène a été effectuée avec du tampon citrate pH = 6 , 45 min à 95 ° C. Les peroxydases et les phosphatases endogènes ont été bloquées avec des inhibiteurs (dual endogenous enzyme block, Dako Cytomation , S2003), et les lames ont été incubées une nuit à 4 ° C avec l'anticorps primaire (Abcam , ab5694 , polyclonal de lapin anti-alpha actine de muscle lisse, 1/ 5000) , suivie d'une incubation pendant 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort, Jackson Immunoresearch , 111-035-003). La coloration a été révélée avec un substrat de la peroxydase (DAB Impact). L'épaisseur du muscle lisse et la densité du tissu ont été mesurés avec le logiciel *Cell dimension software* couplé à une caméra DP72 (Olympus) sur deux niveaux pour chaque animal.

Dans une deuxième partie, des sections de trois μm ont été contre-colorées avec le DAPI (ABDserotec, BUF061). Le nombre de cellules (mis en évidence par leur noyau coloré en bleu avec le DAPI) et la zone de tissu (visualisée par l'auto- fluorescence verte des tissus) ont été mesurés avec le logiciel *Cell dimension software* couplé à une caméra DP72 (Olympus) sur deux niveaux pour chaque animal .

III.5.13. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la résistance de la trachée

Le but de cette expérience était de tester la réactivité de la trachée isolée des souris pour vérifier les résultats obtenus en pléthysmographie et en flexion suite à un traitement chronique des animaux au formotérol. Ces expériences ont été réalisées dans le laboratoire du

Professeur Philippe Devillier (Upres EA 220, Suresnes) essentiellement selon la procédure décrite par le Dr Emmanuel Naline et collaborateurs (Naline *et al.*, 1994). Dans cette expérience, des souris WT et KO GASP-1 (8 souris par groupes) ont été traitées quotidiennement au formotérol (400 µg/kg, i.n.) ou avec une solution saline/cyclodextrine pendant 35 jours puis la trachée des animaux a été prélevée et la réactivité des trachées à différentes doses d'acétylcholine et de fomotérol a été analysée (Naline *et al.*, 1994 ; Faisy *et al.*, 2002) .

III.5.14. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm la déviation standard. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel prism. Les différences entre les groupes ont été testées pour la significativité statistique en utilisant une ANOVA à deux facteurs et le test de Bonferroni en post-test ou une ANOVA à un facteur suivie par un test de Tukey en post-test. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

III.6. Méthodes utilisées dans les expériences avec des cellules en culture

III.6.1. Les cellules utilisées

III.6.1.1. Culture de cellules musculaires lisses des voies aériennes humaines : les CML

Les cellules primaires de muscle lisse bronchique (CML) proviennent de donneurs de greffe de poumon sains décédés de mort subite (France-Transplant, Nancy France; Freund-Michel *et al.*, 2002). Le muscle lisse bronchique a été soigneusement disséqué, coupé en petits fragments et cultivé dans du milieu RPMI (Roswell Institut Memorial Park) milieu 1650 contenant L-glutamine (2 mM) , la pénicilline (50 U· mL⁻¹) et de la streptomycine (50 µg·mL⁻¹), et supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FCS). Les cellules ont été caractérisées dans l'équipe de Nelly Frossard (Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Illkirch, France). Lorsqu'elles sont cultivées à faible concentration en sérum pendant 48h, elles

présentent la morphologie typique des cellules musculaires lisses ("collines et les vallées"). Par ailleurs, en immunocytochimie, elles sont réactives à des anticorps dirigés contre la vimentine et l'alpha-actine du muscle lisse (Dako, Trappes, France) et leur degré de pureté a été estimé à 98 % (Freund-Michel *et al.*, 2006). Plusieurs lots de cellules, provenant de plusieurs patients sont disponibles au laboratoire. Pour mes études, nous avons principalement travaillé avec le patient 7C.

Les cellules CML sont cultivées en atmosphère humide (37°C, 5% CO₂) dans des flacons de 75cm² en présence de milieu complet de croissance (SVF 10%) constitué de : DMEM HAMF12 sans glutamine (500ml), 4.5g glucose/l (Fisher Scientific, M3491F), L-glutamine (5ml ; Fisher Scientific, M3497P), Acides aminés non essentiels (5ml ; Fisher Scientific, M3409T), Pénicilline-Streptomycine (2,5ml ; Fisher Scientific, M3470H), insuline 889µl à 67,5U/ml ; SIGMA I-5500).

Lorsque les cellules atteignent 90% de confluence, elles sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0,25%)-EDTA (5 mM) puis ré-ensemencées à plus faible densité afin d'être passées une fois par semaine. Le milieu est aspiré et les cellules sont lavées par 10 ml de PBS 1x préchauffé puis incubées 3 à 5 min en présence de 1.5 ml de trypsine/EDTA. Après incubation, l'ajout de 10 ml de milieu complet va stopper l'action de la trypsine. Les cellules sont ré-ensemencées à la densité souhaitée. Les cellules ont été utilisées au maximum jusqu'au huitième passage.

III.6.1.2. Les cellules HEK293 et leur condition de culture

Les HEK 293 sont des cellules immortalisées issus de rein embryonnaire humain. Elles sont cultivées en atmosphère humide (37°C, 5% CO₂) dans des flacons 75cm² en présence de milieu complet. Le milieu complet est constitué de Minimum Essential Medium (MEM), de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine) et de 2 mM de glutamine. Lorsque les cellules atteignent 90% de confluence, elles sont trypsinisées puis ré-ensemencées à plus faible densité afin d'être « passées » deux fois par semaine. Le milieu est aspiré et les cellules sont lavées par 10 ml de tampon phosphate salin (PBS 1x) puis incubées 3 à 5 min en présence de 1.5 ml de trypsine diluée (0.25%). Après incubation, l'ajout de 10 ml de milieu complet va stopper l'action de la trypsine. Les cellules sont ré-ensemencées à la densité souhaitée. Les antibiotiques, le MEM, le SVF et la trypsine sont fournis par GIBCO (Invitrogen Corporation).

III.6.1.3. Congélation et décongélation

Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont rincées avec 10 ml de PBS, décollées comme décrit précédemment et reprises dans 10 ml de milieu complet. Après 5 minutes de centrifugation à 1000 rpm, le culot cellulaire est repris dans 1 ml de milieu de congélation froid (90% SVF + 10 % de diméthyl sulfoxyde), 1 ml de suspension cellulaire est congelé dans des cryotubes à -80°C pendant une semaine puis ils sont transférés dans azote liquide pour une conservation à long terme. Pour la décongélation, le contenu cellulaire d'un cryotube est rapidement décongelé au bain-marie (37°C), puis il est transféré dans un flacon 75 cm² contenant 14 ml de milieu complet. lorsque les cellules ont adhéré, le milieu est remplacé par 15 ml de milieu complet.

III.6.2. Evaluation de la présence des récepteurs bêta-2 adrénergiques dans les CML

Trois quantités différentes de cellules ont été testées : 250000, 500000 et 1000000 selon le protocole décrit dans la partie III.5.5. Brièvement, les essais de liaison ont été réalisés en triplicats dans des tubes MinisorbTM (Nunc) dans du tampon 50mM Tris-HCl pH 7,7 (volume final de 500µl), en présence d'une concentration saturante du ligand radioactif bêta-adrénergique non sélectif [³H]CGP 12 177 (Perkin Elmer) à une concentration de 2nM. La distinction entre récepteurs B1 et B2-AR se fait par addition dans 2 duplicats supplémentaires respectivement de 500nM d'antagoniste spécifique B2-AR : ICI 118 551 ou 2µM de l'antagoniste sélectif du B1-AR : CGP 20 712A. La liaison non spécifique est mesurée à l'aide d'un antagoniste non sélectif, l'alprénolol à une concentration finale de 2µM.

III.6.3. Détection de l'expression de GASP-1 et de la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot

III.6.3.1. Les différents anticorps utilisés

L'anticorps polyclonal anti-GASP1 a été développé au laboratoire, il est dirigé contre la partie carboxyl-terminale de GASP1 (résidus 924-1395 ; Simonin *et al.*, 2004 ; Boeuf *et al.*,

2009) il a été utilisé à une dilution de 1/10000. L'anticorps polyclonal dirigé contre GASP2 a été réalisé par Genscript, il reconnaît un peptide de 18 acides aminés (résidus 252-269) de GASP-2 humain. Il a été utilisé à une dilution de 1/2000. L'anti phospho ERK1/2 (Thr202 et Tyr204, polyclonal de lapin de chez Invitrogen) a été utilisé à une dilution de 1:5000. L'anti ERK total (polyclonal de lapin de chez Enzo Life Sciences) a été utilisé à une dilution de 1:10000. Deux anticorps secondaires ont été utilisés : un anti-lapin HRP (1/10000, IgG de chèvre ; Immuno Resarch Laboratories) et un anti-souris HRP (1/10000, IgG de mouton ; GE Healthcare).

III.6.3.2. Les tampons

A. Le tampon PBS

En général, le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) contient des sels en concentration identique à celle du corps humain. Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter. Il est prévu pour un usage sur les cellules maintenues hors de l'incubateur à CO₂ et n'est pas conçu pour des incubations à long terme. Ce tampon est composé de NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM) Na₂HPO₄·2H₂O (4.3 mM) et KH₂PO₄ (1.4 mM) pH ~ 7.3.

B. Le tampon Hepes-BSA (HBSA)

Ce tampon HBSA est un milieu synthétique qui remplace le milieu de culture pour les expériences en dehors de l'incubateur. Le tampon HBSA contient : NaCl 137.5 mM, MgCl₂ 1.25 mM, CaCl₂ 1.25 mM, KCl 6 mM, glucose 5.6 mM, Hepes 10 mM et NaH₂PO₄ 0.4 mM. Après ajustement du pH à 7.4, et ajout de Bovin Serum Albumine (BSA) 0.1%, le tampon est stérilisé par filtration (filtre avec des pores de diamètre 0.22 µm), aliquoté et conservé à -20°C.

C. Le tampon de lyse Triton

Ce tampon est composé de : Tris-HCl pH 7.4 10 mM ; NaCl 150 mM ; KCl 25 mM ; CaCl₂ 1 mM ; 1x inhibiteur de protéase (Roche cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free) ; 1x inhibiteur de phosphatase (Roche, phosphatase inhibiteur cocktail) ; Triton X-100 0.3%.

D. Tampon de lyse RIPA

Ce tampon est composé de : 50mM de Tris-HCl pH 7.4; 150mM de NaCl; 1% de NP40 ; 0.25% de Na-deoxycholate ; 0.1% SDS ; 1x inhibiteur de protéase « Roche cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free» ; 1x inhibiteur de phosphatase « Roche, phosphatase inhibiteur cocktail »

E. Tampon de charge

Le tampon de charge utilisé pour charger les protéines en gel SDS-PAGE est concentré 4 fois. Il est composé de : Tris-HCl pH 6.8 50mM, 36% urée (m /v), 6% β mercaptoéthanol (v/v), 15% SDS 20% (v/v), bleu de bromophénol. Il est conservé à -20°C.

III.6.3.3. Préparation des extraits protéiques pour analyse par Western Blot

Le tampon utilisé pour lyser les cellules mammifères est le tampon RIPA. Les échantillons sont vortexés pendant 1 heure à 4°C puis soniqués afin de casser l'ADN. Afin de limiter la variation de quantité de protéines déposées sur le gel, on effectue un dosage par la méthode de Bradford (Sigma) des différents échantillons.

5 μ l de lysat protéique à doser sont ajoutés à 500 μ l d'H₂O milliQ puis vortexés 3 secondes. On rajoute ensuite 500 μ l de solution de Bradford et on vortexe à nouveau 3 secondes. On laisse incuber 5 minutes puis on mesure l'absorbance à 595 nm. Afin de quantifier les protéines présentes, une gamme étalon est effectuée : 500 μ l H₂O milliQ + 5 μ l de tampon RIPA + 0 à 10 μ l de protéine BSA (1mg/ μ g).

III.6.3.4. Séparation des protéines par gel SDS-PAGE

Une fois les échantillons mélangés au tampon de charge 4x, ceux-ci sont chauffés à 93°C 3 minutes. Ils sont ensuite placés dans la glace 5 minutes puis centrifugés (3 minutes, 15.000g, 4°C) avant d'être chargés sur le gel SDS-PAGE. Le marqueur de poids moléculaire de protéine (Fermentas PageRuler™ 10-170) est chargé en même temps.

La préparation des gels polyacrylamide se fait telle que montrée dans le tableau ci-dessous. Des gels de concentration en acrylamide 8% sont utilisés afin d'observer les protéines de la famille GASP alors que des gels d'une concentration en acrylamide de 12% sont utilisés pour

observer les acteurs des voies de signalisation. Une solution H₂O + 0.1% SDS est déposée sur le gel de séparation le temps qu'il polymérise. La migration des échantillons est réalisée dans du tampon de migration tris-glycine (Tris 25 mM, glycine 200 mM et SDS 0.1%) et se fait à 80 Volts constants jusqu'à ce que les échantillons arrivent dans le gel de séparation (30 minutes) puis à 150 Volts pour la migration dans le gel de séparation.

Composition des gels de séparation (8 et 12% acrylamide) et de concentration (4% acrylamide) pour la migration des échantillons protéiques.

Gel de séparation			Gel de concentration		
8%		12%	4%		
Tampon	Tris- 5 ml	5 ml	Tampon	Tris-HCl 1 M	2,5 ml
	HCl 1,5 M			pH 6,8	
	Acrylamide 5,33 ml	8 ml	Acrylamide 30%		1,5 ml
	30%				
	H ₂ O 9,2 ml	7 ml	H ₂ O		6 ml
	SDS 20% 100 µl	100 µl	SDS 20%		50 µl
	APS 10% 150 µl	150 µl	APS 10%		100 µl
	TEMED 15 µl	15 µl	TEMED		10µl

III.6.3.5. Transfert des protéines sur membrane

Les protéines séparées par leur taille sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride ; millipore). Les membranes sont placées 20 secondes dans de l'éthanol 100% puis rincées 10 minutes dans le H₂O milliQ pour être finalement équilibrées dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 200 mM, EtOH 20% et SDS 0.01%). Une fois la migration finie, les gels sont rincés dans du tampon de transfert afin d'enlever le SDS puis monter avec les membranes de PVDF en sandwich. Le transfert des protéines du gel à la membrane s'effectue à 250 mA constant à l'aide d'un appareil de transfert pendant 2 heures (4°C) pour les acteurs des voies de signalisation et à 30 Volts constants durant une nuit pour les protéines de la famille GASP (4°C).

III.6.3.6. Révélation des protéines d'intérêt

Une fois le transfert terminé, les membranes sont récupérées et incubées pendant une heure dans une solution de blocage (PBS 1x, Lait 5% p/v et Tween 0.1% v/v) afin de saturer la membrane de protéines. Les membranes sont alors incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires. S'en suit une série de lavages des membranes (2x5 minutes, 1x15 minutes puis 2x5 minutes) avec une solution de lavage (PBS 1x, Lait 5% m/v et Tween 0.1% v/v) afin d'éliminer l'excès d'anticorps. S'en suit une incubation de 40 minutes avec une solution de blocage contenant les anticorps secondaires couplé à la HRP (horseradish peroxydase). Une nouvelle série de lavage (PBS 1x et Tween 0.1% v/v) est alors effectuée (2x 5minutes, 1x15 minutes puis 4x 5 minutes) afin d'éliminer le maximum d'anticorps secondaires qui ne se seraient pas fixés à leurs anticorps cibles. Un substrat chemiluminescent de HRP (ImmobilonTM Western, Millipore) est alors utilisé comme révélateur. Les membranes sont alors incubées avec ce substrat durant 5 minutes dans le noir, puis on récupère les blots qui sont alors séchés afin d'être révélés soit en chambre noire à l'aide de film (GE Healthcare) soit à l'aide d'une caméra CCD couplée au système d'exploitation ImageQuant (GE Healthcare).

Afin de pouvoir réutiliser les blots avec d'autres anticorps, chaque anticorps peut être désorbé des membranes de PVDF par lavage acide avec du tampon de désorption (0.2M HCl, 0.4M Glycine ; 1x10 minutes et 2x 15 minutes). S'en suit un rinçage avec la solution de lavage afin d'enlever le maximum d'acidité avant l'incubation dans la solution de blocage.

III.6.4. Mesure de la libération de calcium intracellulaire Ca²⁺

L'expérience se déroule en 4 étapes majeures :

Jour 0 :

1-étalement des cellules CML dans des T75 afin d'avoir environ 3-4 millions de cellules, soit une confluence de 80/90%, le jour de la mesure calcique.

2- les cellules sont étalées dans du milieu contenant 0.3% de sérum (72h au total).

Jour 1 : Ré-étalement des cellules en plaque 96-puits 30.000 cellules CML par puits et activation par formotérol (10µM) pour 48hd'activation au total..

Jour 3 : Mesures Calciques: Les cellules sont incubées en présence de 2 μ M de Fluo-4 (sonde calcique ; life technologies) et de 2,5 mM de probénécide dans du tampon HBSA (voir III.6.3.2) durant 1 heure à 37°C dans l'obscurité. Le probénécide, un inhibiteur du transport des acides organiques, prévient la fuite du Fluo-4 hors du cytoplasme.

Des dilutions en série d'agonistes (bradykinine et thrombine, Sigma-Aldrich) ont été préparées dans une plaque séparée à une concentration cinq fois supérieure à la concentration finale souhaitée. La mesure a été réalisée avec le fluorimètre FLEX Station III (Molecular Devices). Les unités de fluorescence relative (RFU) sont mesurées toutes les 2 secondes pendant une période de 180 secondes après l'addition de l'agoniste à 40sec. Les résultats ont été tracés comme le signal minimum normalisé à un pour chaque concentration d'agoniste au cours de cette période. Les graphiques représentent les résultats (moyenne \pm déviation standard) de trois expériences indépendantes au minimum.

III.6.5. Transfections

III.6.5.1. Les plasmides utilisés pour les tests de transfection des cellules CML

A. Les plasmides pcDNA3.1/Néo et Hygro

Le pcDNA3.1 (Invitrogen) est un vecteur d'expression eucaryote dérivé de pcDNA3 et développé pour obtenir l'expression stable ou transitoire de protéines recombinantes dans des cellules hôte de mammifère. Il contient un promoteur CMV (*human cytomegalovirus*) permettant un fort taux d'expression dans la plupart des cellules eucaryotes et un gène de résistance soit à la néomycine, nommée également G418 (pcDNA3.1/Neo), soit à l'hygromycine (pcDNA3.1/Hygro) permettant une sélection des cellules ayant reçu ou intégré le plasmide. Le vecteur pcDNA3.1 possède également un gène de résistance à l'ampicilline qui permet de sélectionner les bactéries transformées avec ce plasmide lors du clonage ou de l'amplification plasmidique (Figure 23).

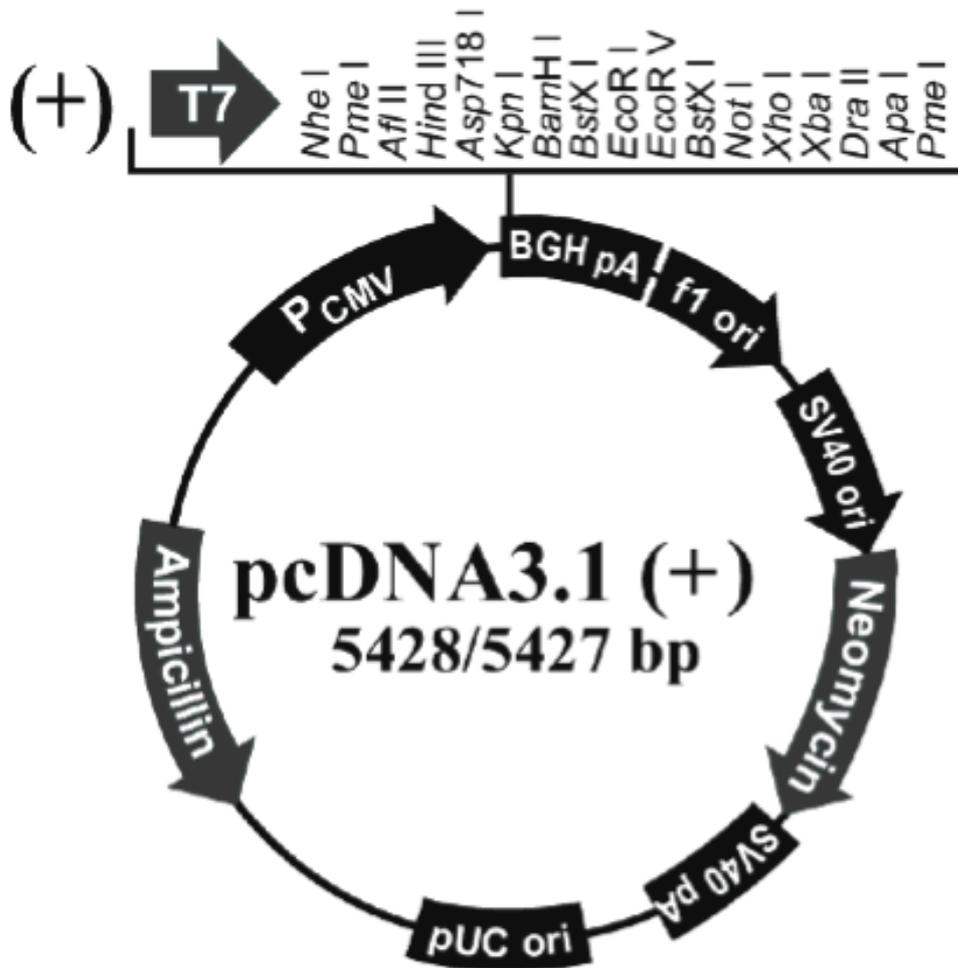


Figure 23 : Vecteurs d'expression eucaryote pcDNA3.1/Néo.

Ampicillin, gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) ; BGH pA, signal de polyadénylation issu de l'hormone de croissance bovine ; Pcmv, promoteur cytomégalo virus humain ; Néomycine, gène de résistance au G418 ; pUC ori : origine de répliation dans *E.coli* ; SV40 ori : origine de répliation dans les cellules Cos contenant l'antigène T ; SV40 pA : signal de polyadénylation de l'ARNm ; T7 : promoteur/site d'amorce T7.

B. Le plasmide pmaxGFP

Le plasmide pMAX-GFP est un vecteur d'expression en cellule mammifère qui contient des éléments similaires au pcDNA3.1. Il est cependant destiné exclusivement à l'expression transitoire car il ne contient pas de gène de résistance eucaryote (Figure 24). Il est fourni comme contrôle dans le kit de transfection (Lonza-Amaya). Il permet l'expression de la protéine GFP.

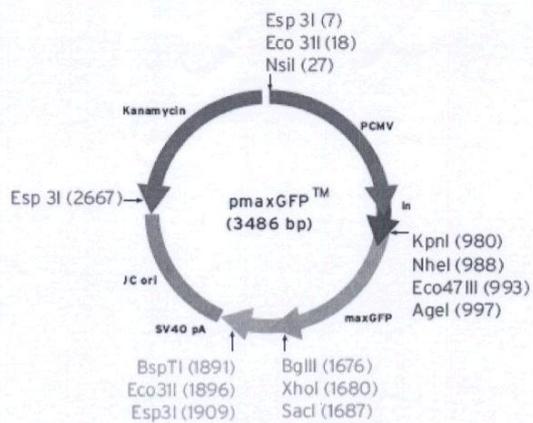


Figure 24 : Vecteur d'expression eucaryote pmaxGFP

Les éléments présents dans ce vecteur sont similaires à ceux présents dans le pcDNA3.1 (voir Figure 23)

C. Les plasmides pcDNA3 YFP-GASP1 et pcDNA3-14-3-3 bêta-mYFP

Le vecteur pcDNA3 YFP-GASP-1 réalisé au laboratoire est dérivé du pcDNA3.1 dans lequel la séquence codant pour GASP-1 entier (résidus 1 à 1395 ; numéro d'accèsion NM_014710.4) a été clonée en fusion 5' avec le cDNA codant pour la YFP (yellow fluorescent protein) qui est un variant de la GFP. La carte de ce vecteur est représentée dans la figure 25. De la même manière, le vecteur pcDNA3-14-3-3 bêta-mYFP code pour une protéine de fusion comprenant la totalité de la séquence codante de 14-3-3 bêta (résidus 1 à 743 ; numéro d'accèsion NM_003404.3) en fusion avec la YFP à son extrémité carboxyl-terminale (Michel *et al.*, 2014; Hachet-Hass *et al.*, 2006).

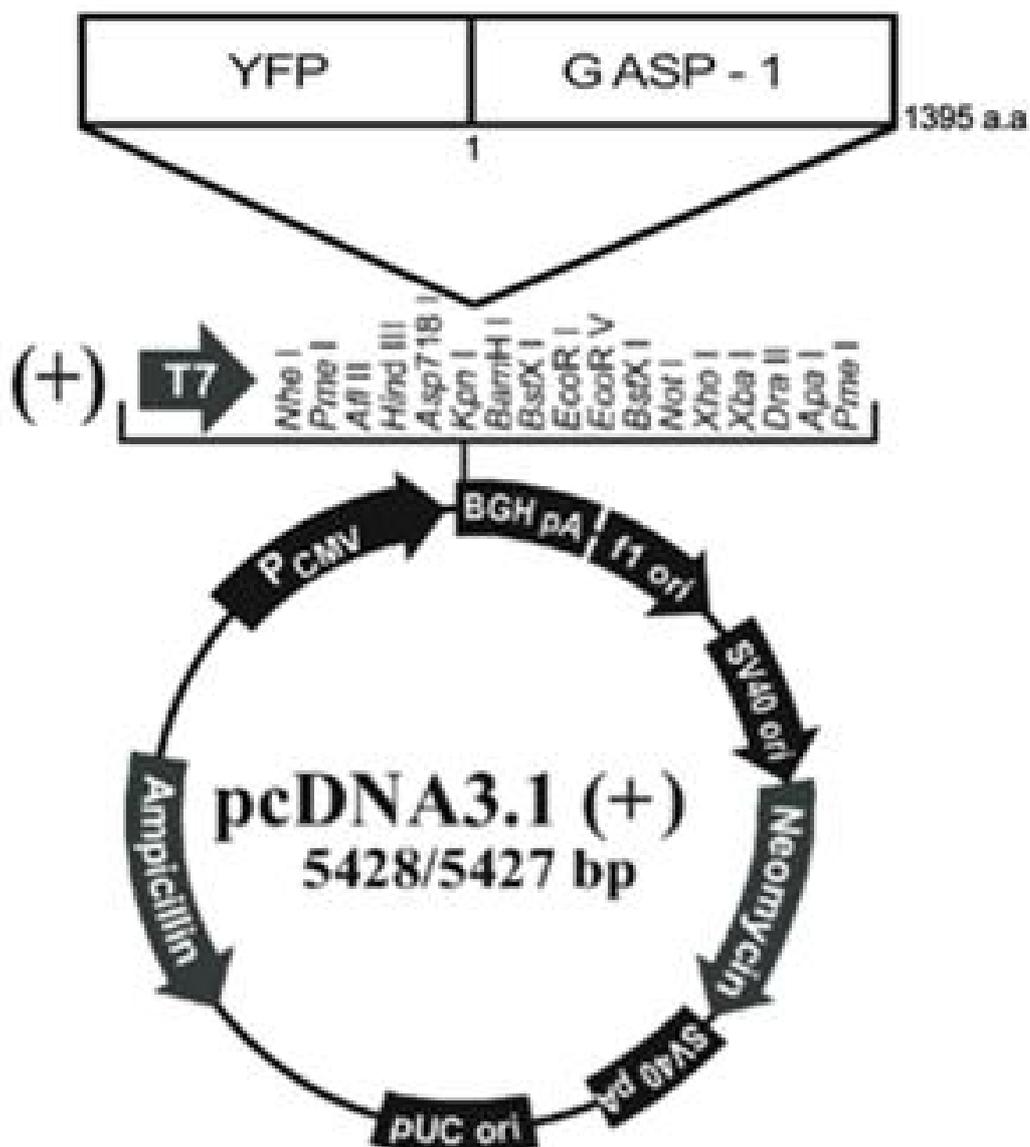


Figure 25: Vecteur d'expression pcDNA3 YFP-GASP1

Hormis la séquence codant pour la protéine de fusion YFP-GASP-1 les autres éléments sont les même que pour le pcDNA3.1 (Figure 23).

III.6.5.2. Amplification et purification des plasmides pour les transfections

Les plasmides ont été produits dans des bactéries *E. coli* XL1-Blue ou TOP10 cultivées en suspension dans du milieu LB (10 g/L tryptone ; 5 g/L d'extrait de levure ; 10 g/L NaCl) stérile, à 37°C et sous agitation vigoureuse. L'ADN Plasmique est purifié à l'aide du kit de purification Nucleobond® PC 500 (Macherey-Nagel) sur le principe de la lyse alcaline. Les

concentrations en ADN et la qualité des préparations sont déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm.

III.6.5.3. Transfection des cellules avec la technologie 4D-Nucleofector

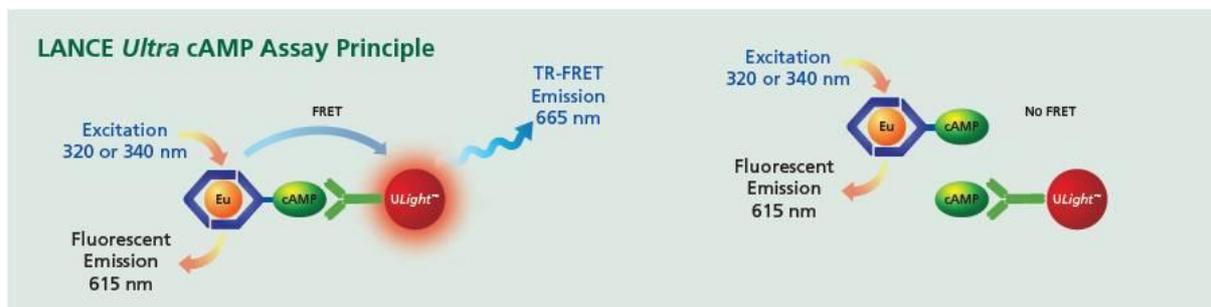
Nous avons transfecté le pcDNA3-EYFP-GASP1 dans des CML humaines en utilisant un protocole optimisé pour cellules musculaires lisses primaires (Lonza-Amaxa ; programme 3, Pulse EA120 avec 400,000 par puits) à l'aide de la technologie 4D-Nucleofector (Lonza-Amaxa) qui combine la transfection chimique et l'électroporation. Nous avons utilisé les vecteurs pmaxGFPet pcDNA3-14.3.3 bêta-mYFP comme contrôles positifs. Les transfections sont effectuées dans des barrettes de 8 tubes qui ont la taille des plaques 96-puits. Dans un premier temps, on met 400,000 cellules par tube contenant chacun 16,4 µl de solution de transfection et 3,6 µl de supplément fourni dans le kit, puis on rajoute 1 µg d'ADN et on reprend 20 µl du contenu des tubes que l'on verse dans des puits (barrettes). Ces barrettes sont ensuite placées dans le 4D-Nucleofector et on lance le programme avec les paramètres préalablement définis. On récupère les barrettes qu'on laisse incuber à température ambiante pendant 5 minutes. On y ajoute 80 µl de milieu chaud complet, on mélange deux fois puis on transfère 40 µl dans du milieu préalablement déposé par puits d'une plaque 96-puits de culture cellulaire. La plaque de cellules est ensuite placée dans un incubateur et la fluorescence et la confluence des cellules sont suivies au cours du temps avec un microscope à fluorescence et à contraste de phase pour micro-plaques (Incucyte) qui peut se placer dans un incubateur de cellules. Ce microscope permet l'évaluation de la confluence des cellules par un logiciel d'analyse d'image intégré à partir des images prises en contraste de phase.

III.7. dosage de l'AMPc à l'aide du kit Lance Ultra (PerkinElmer)

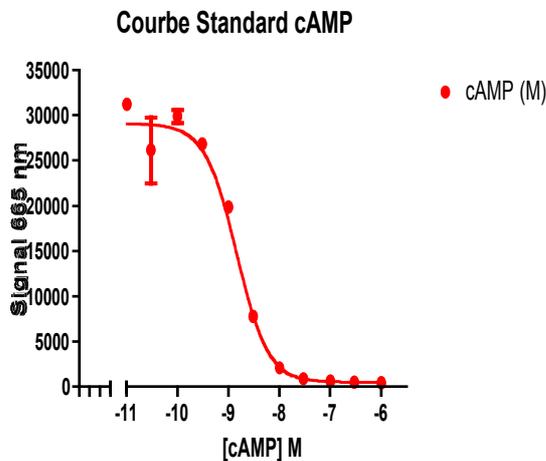
L'essai Lance Ultra est un immuno-essai basé sur la mesure de transfert d'énergie par résonance de fluorescence en temps résolu (TR-FRET) qui permet de travailler dans des mélanges complexes avec une grande sensibilité. L'essai est basé sur la compétition entre un traceur d'AMPc marqué au chélate d'euporium (Eu) et l'AMPc issu d'un échantillon pour un anticorps monoclonal spécifique de l'AMPc marqué avec le colorant Ulighttm (voir Figure 26A). Quand les anticorps sont liés au traceur AMPc-Eu on peut produire du TR-FRET par excitation à 320 ou 340 nm du mélange ce qui générera une émission maximale à 665 nm par

transfert d'énergie. L'AMPc produit par des cellules stimulées pourra rentrer en compétition avec ce processus et diminuera le signal observé de manière dépendante de sa concentration dans l'échantillon. Les dosages ont été effectués selon les recommandations du fabricant. 2000 cellules HEK293 (contrôle positif) et 2000 CML ont été utilisées pour chaque détermination. Sur la Figure ci-dessous est représenté une courbe standard de compétition obtenue avec de l'AMPc pur (Figure 26B) et une courbe dose réponse de forskoline (activateur de l'adenylate cyclase) réalisée avec des cellules HEK293 et des CML (Figure 26C)

A



B



C

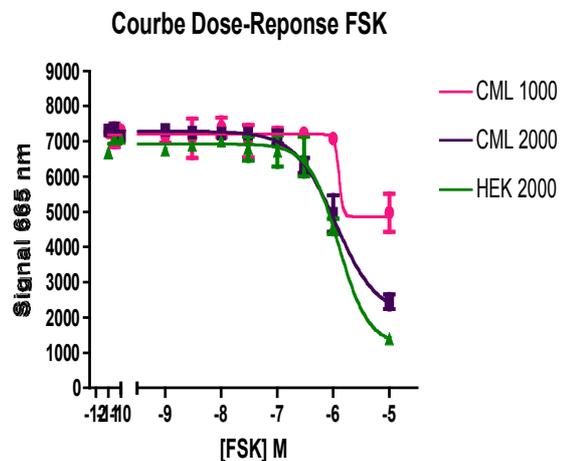


Figure 26: Dosage de l'AMPc à l'aide du kit Lance Ultra.

A. Principe de l'essai Lance Ultra (Perkin Elmer). B. Courbe Standard réalisée avec de l'AMPc pur et C. Courbe dose-réponse de forskoline réalisée avec les 2 types cellulaires CML P7C et HEK29

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.A. Mise en place d'un modèle d'hyperréactivité bronchique induite par les agonistes bêta2-adrénergique chez la souris et analyse du phénotype des souris KO GASP-1 dans ce modèle

L'objectif principal de ce projet a été d'évaluer l'implication de GASP-1 dans les effets secondaires associés à l'administration chronique d'agoniste bêta-2 adrénergique dans le cadre du traitement de l'asthme chez la souris.

IV.A.1. Mise en évidence de la présence ou de l'absence de GASP-1 dans les cerveaux et les poumons des animaux utilisés.

La première étape de ce projet a consisté à vérifier la présence de la protéine GASP-1 dans le poumon de souris. Après un mois de traitement quotidien au formotérol ou à la solution saline, nous avons testé la réactivité bronchique des souris à la métacholine et sacrifié les animaux. Ils ont été disséqués, et leurs poumons et cerveaux récupérés et conservés à -80°C.

Afin de vérifier la présence de GASP-1 chez les animaux WT et son absence chez les animaux transgéniques, nous avons préparé des extraits protéiques à partir des cerveaux. La protéine d'intérêt, GASP-1, a un poids moléculaire apparent de 190kD lorsque la protéine est migrée en condition dénaturante sur gel SDS-PAGE. Nous avons fait migrer 20 µg de protéines de chaque échantillon sur un gel 8% acryl/bisacrylamide, puis nous avons réalisé un Western Blot avec un anticorps polyclonal anti-GASP-1 qui reconnaît également GASP-2. Nous avons fait migrer également comme témoin positif un extrait cellulaire de lignée SHSY-5Y (neuroblastome humain), dont on sait qu'il contient les protéines GASP-1 et GASP-2 en abondance. L'ensemble des animaux a été analysé, mais la Figure 27 ne présente les résultats que pour quelques animaux représentatifs.

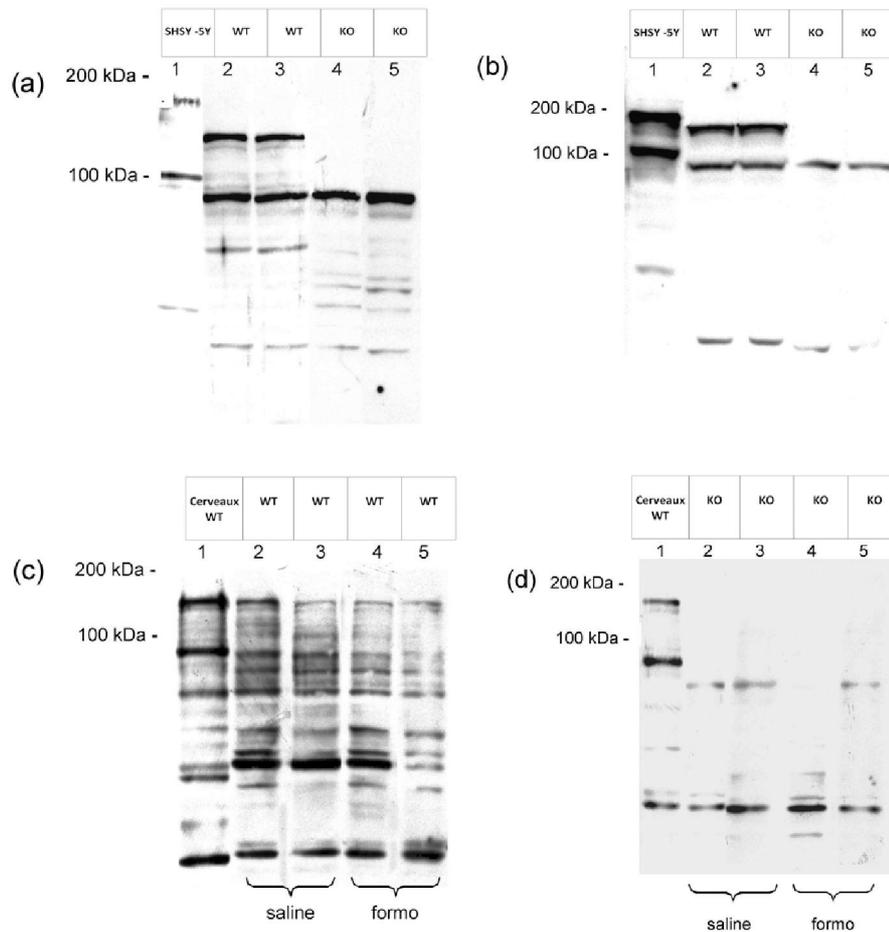


Figure 27 : Mise en évidence de la présence ou de l'absence de GASP-1 dans les cerveaux et les poumons des souris WT et KO GASP-1 par Western blot.

(a) analyse des homogénats de cerveaux de deux souris WT et deux souris KO, traitées au sérum physiologique. Un extrait cellulaire de lignée SHSY-5Y est placé dans le puits 1 comme témoin positif. L'anticorps reconnaît une protéine de 190-kDa de poids moléculaire apparent correspondant à GASP-1 (humain, 1395aa) et une protéine de 100 kDa environ, GASP-2 (humain, 838 aa). Dans les puits 2 et 3, l'anti-corps reconnaît une protéine d'environ 170kDa de poids moléculaire apparent correspondant à GASP-1 chez la souris (1347 aa) et une protéine d'environ 80kDa correspondant à GASP-2 (826 aa). (b) analyse des homogénats de cerveaux de deux souris WT et deux souris KO, traitées au formotérol. Un extrait cellulaire de lignée SHSY-5Y est placé dans le puits 1 comme témoin positif. (c) analyse des homogénats de poumons de deux souris WT traitées au sérum physiologique (puits 2 et 3) et deux souris WT traitées au formotérol (puits 4 et 5). (d) analyse des homogénats de poumons de deux souris KO traitées au sérum physiologique (puits 2 et 3) et deux souris KO traitées au formotérol (puits 4 et 5).

Comme on peut le voir sur la Figure 27a, dans la piste 1 correspondant aux SH5Y-5Y, on distingue deux bandes immunoréactives principales d'un poids moléculaire apparent d'environ 190 et 100 kDa correspondant respectivement à GASP-1 et GASP-2. Dans les pistes 2 et 3 correspondant à deux extraits de cerveau de souris WT, on constate également la présence de deux bandes immunoréactives majoritaires de taille légèrement inférieure à celles présentes dans l'extrait de cellules humaines. Ces deux bandes correspondent très probablement à GASP-1 et GASP-2 car le nombre d'acides aminés des GASP-1 et GASP-2 de souris est légèrement inférieur aux protéines humaines (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez, codes Q5U4CI versus Q5JY77).

Par ailleurs, on peut voir que dans les deux extraits de cerveau de souris KO (Figure 27a, pistes 4 et 5) la bande correspondant à GASP-1 est absente, ce qui confirme la spécificité de l'anticorps que nous avons développé ainsi que l'absence de GASP-1 dans les souris KO. De plus, si on compare les pistes correspondantes aux animaux WT et KO GASP-1, il ne semble pas y avoir de modification majeure du niveau d'expression de GASP-2, ce qui suggère qu'il n'y a pas de phénomène de compensation important à ce niveau dans les animaux KO GASP-1. Nous avons pu réaliser les mêmes observations sur les animaux ayant été traités au formotérol (Figure 27b, pistes 2, 3, 4 et 5) qui ont été utilisés dans le reste de l'étude.

Nous avons ensuite analysé de la même manière les organes d'intérêt pour notre expérience, c'est-à-dire les poumons. Bien que l'obtention de préparations protéiques de qualité satisfaisante soit délicate, nous avons pu analyser l'ensemble des animaux. Les résultats pour deux animaux WT et deux animaux KO GASP-1 non traités sont présents respectivement dans la Figure 27c pistes 2 et 3 et dans la Figure 27d pistes 2 et 3. Le contrôle positif utilisé ici correspond à un extrait de cerveau (piste1). Dans les pistes 2 et 3 de la Figure 27c, on peut voir qu'une bande immunoréactive migrant au même niveau que GASP-1 est présente, alors qu'elle est absente chez les souris KO GASP-1 (pistes 2 et 3 de la Figure 27d). Ces résultats indiquent que GASP-1 est exprimé dans le poumon. Cependant, le niveau d'expression semble être plus faible que dans le cerveau. Par ailleurs, chez les souris WT, le niveau d'expression de GASP-1 ne semble pas affecté par le traitement au formotérol (Figure 27c pistes 3 et 4). Enfin, bien que de nombreuses bandes immunoréactives soient présentes et rendent l'interprétation difficile, il semble y avoir une bande immunoréactive à la taille de GASP-2 chez les WT et les KO GASP-1 (Figures 27c et 27d), ce qui suggère que cette protéine est exprimé dans le poumon mais à un faible niveau. De plus, le niveau d'expression

de cette protéine ne semble pas modulé par le traitement au formotérol (Figures 27c et 27d)

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent la présence de GASP-1 dans les poumons de souris sauvages. Son expression ne semble pas affectée par un traitement chronique au formotérol. Par ailleurs, le faible niveau d'expression de GASP-2 dans le poumon et son absence de variation à la suite du traitement chronique au formotérol suggère que la déficience en GASP-1 dans cet organe ne peut pas être compensée par GASP-2.

IV.A.2. Effet aigu du salbutamol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'administration par voie nasale d'un agoniste β_2 -AR à courte durée d'action (SABA) sur l'hyperréactivité bronchique provoquée par la métacholine à l'aide du Flexivent. La métacholine est un agoniste du récepteur muscarinique M3 qui est exprimé dans le poumon et dont la stimulation provoque une bronchoconstriction. Nous avons traité 4 souris WT avec 1mg de salbutamol/souris, et traité 4 souris WT avec une solution saline pour contrôle. Ces souris présentaient le même fond génétique que les souris KO (50% C57BL/6 - 50% SV/129) qui ont été utilisées dans les études ultérieures. La dose de salbutamol utilisée a été déterminée à partir des éléments disponibles dans la littérature. Les résultats sont présentés dans la Figure 28. Nous avons d'abord analysé la réactivité bronchique des animaux en réponse à l'administration de PBS pour évaluer la réactivité de base en présence et en absence du salbutamol. Ensuite, les souris sont soumises à des nébulisations de la métacholine pour mesurer la réactivité bronchique en présence et en absence de salbutamol. Les résultats montrent que la métacholine induit une forte bronchoconstriction en comparaison avec les souris exposées au PBS. L'administration de salbutamol par voie nasale avant la nébulisation de la métacholine diminue significativement cette bronchoconstriction ($p < 0,001$), révélant ainsi l'effet bronchodilatateur de ce composé.

Ces résultats indiquent que le flexivent permet de visualiser chez les souris sauvages de fond génétique identique aux animaux KO GASP-1 l'effet bronchoconstricteur de la métacholine et l'effet bronchodilatateur d'un agoniste β_2 AR de référence: le salbutamol (voir Figure 28).

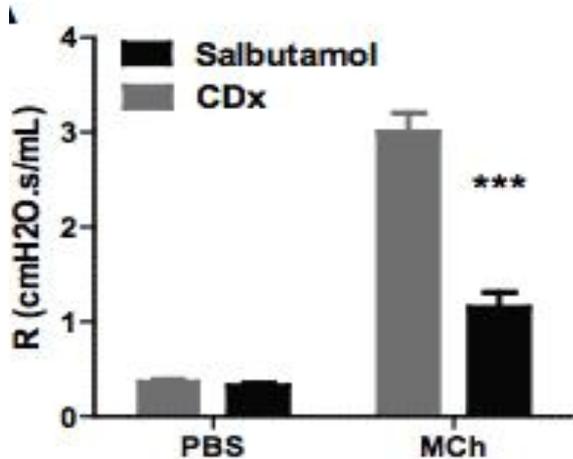


Figure 28. Effet de l'administration intranasale aiguë de salbutamol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris C57BL6J/SV129.

La réactivité des voies aériennes (R) en réponse au PBS ou à une dose unique de métacholine (Mch ; 50mg/kg) avec ou sans administration préalable de salbutamol 1mg/kg a été évaluée par la technique de Flexivent®. Les valeurs correspondent à des moyennes + la déviation standard (n = 4 par groupe). *** p ≤ 0,001 vs CDx-Mch. Pour les animaux contrôle la solution saline a été additionnée de cyclodextrine (CDx) qui est nécessaire pour solubiliser de manière optimale le salbutamol (voir Matériel et Méthode).

IV.A.3. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris sauvages

Nous avons ensuite testé l'effet de trois doses d'un agoniste B2AR à longue durée d'action (LABA), le formotérol (40µg/kg, 400 µg/kg et 1 mg/kg), afin d'identifier la dose optimale qui permet de prévenir au maximum la bronchoconstriction induite par la métacholine en utilisant le Flexivent. Les résultats sont présentés dans la Figure 29. Quatre groupes ont été utilisés, le premier groupe étant traité par le sérum physiologique et les trois autres groupes traités par des doses croissantes du formotérol. Les données obtenues montrent qu'en absence du formotérol, la métacholine induit une forte bronchoconstriction par rapport aux souris témoins nébulisées par le PBS. L'administration de formotérol par voie nasale aux doses de 400 µg/kg et 1 mg/kg diminue significativement (p < 0,01) la bronchoconstriction provoquée par la métacholine. Ces résultats montrent que le formotérol induit une bronchodilatation optimale chez les souris sauvages à ces deux doses (Voir Figure 29). nous avons donc choisi la dose de 400 µg/kg pour le reste de l'étude.

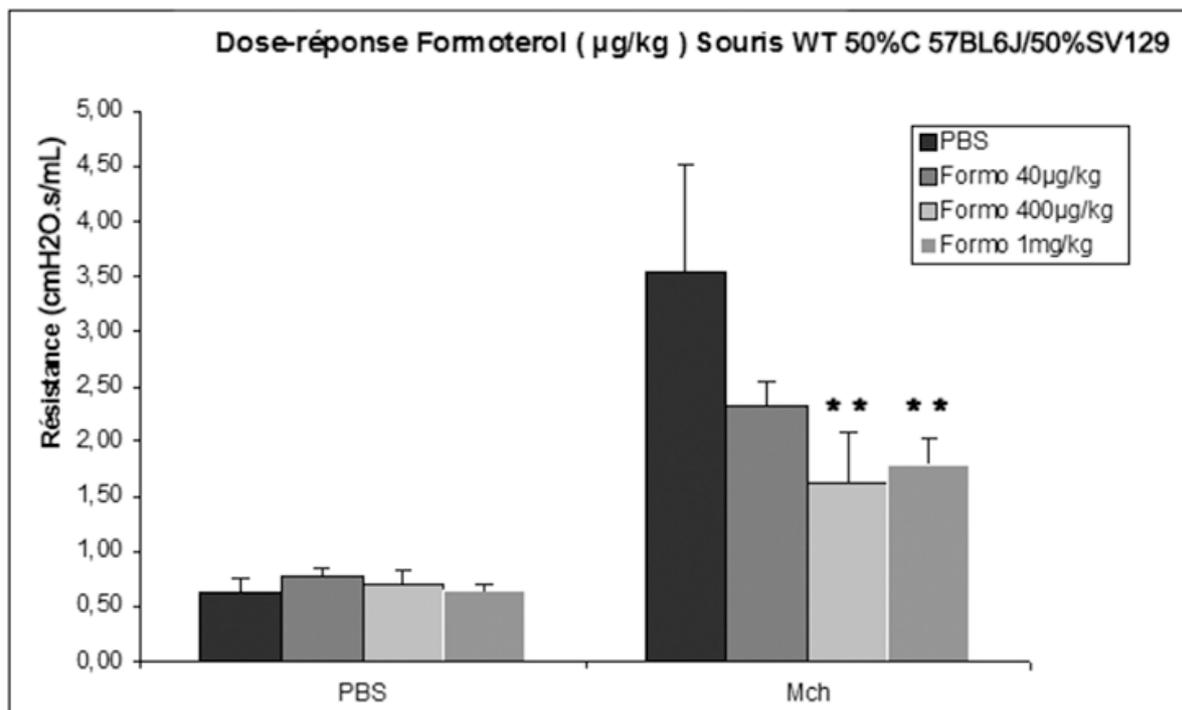


Figure 29 :Effet aigu du formotérol chez les souris WT 50% C57BL6/ 50%SV129

Après le traitement au formotérol ou au sérumphysiologique additionné de cyclodextrine (voir Matériel et Méthodes) la réactivité bronchique des souris est analysée par le flexivent après nébulisation de PBS puis de métacholine, (50 mg/kg). les 3 doses de formotérol diminuent l'effet de la métacholine par rapport au souris contrôles. Les valeurs correspondent aux moyennes + les déviations standards (n = 6 animaux par groupe). ** P < 0,01 vs Mch seule.

IV.A.4. Effet aigu du formotérol sur la réactivité bronchique chez des souris KO GASP1

Le but de cette expérience est d'évaluer l'implication de GASP-1 dans l'effet bronchodilatateur aigu du formotérol en utilisant des souris génétiquement déficientes pour GASP-1. Nous avons traité des souris KO-GASP-1 et WT avec une dose 400 µg/kg de formotérol ou une solution saline comme contrôle. Nos résultats (voir Figure30) ont montré que la métacholine induit une bronchoconstriction similaire chez les WT et les KO GASP1 (p<0,001). De même, il n'y'a pas de différence significative de l'effet bronchodilatateur du formotérol entre les souris KO GASP1 et WT (Figure30).

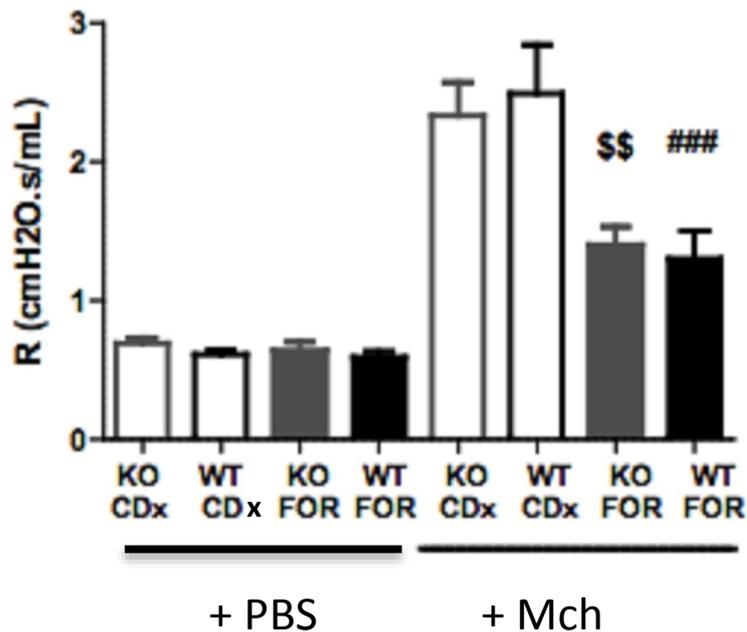


Figure 30 Effet de l'administration intranasale aiguë de formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO GASP-1

La réactivité des voies aériennes à la métacholine (MCh, 50 mg/kg) a été mesurée après l'administration aiguë de formotérol (400µg/kg). Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs obtenues + les déviations standards (n = 8-12 par groupe). \$\$ Indique $p \leq 0,01$ vs KO-CDx + MCH. ### Indique $p \leq 0,001$ vs WT-CDx + MCH. CDx : cyclodextrine dans le sérum physiologique.

IV.A.5. Effet aigu du formotérol sur le nombre de récepteurs bêta-adrénergiques dans les poumons.

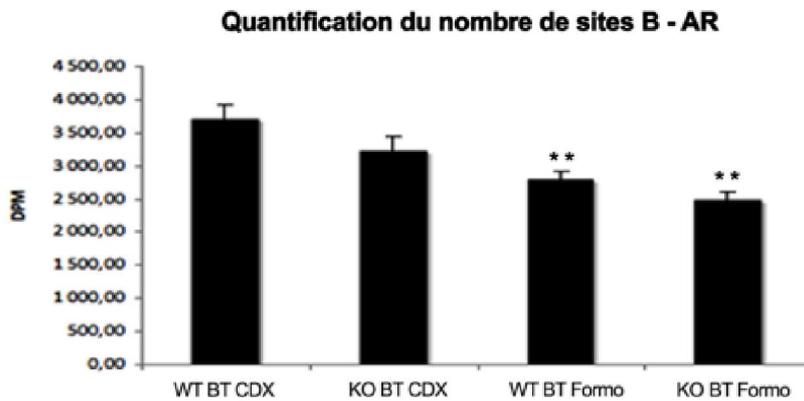
Nous avons par ailleurs voulu quantifier le nombre de sites bêta-adrénergiques totaux (B-AR), bêta1-adrénergiques (B1-AR) et bêta2-adrénergiques (B2-AR) dans chaque groupe afin de corrélérer les résultats obtenus lors de l'expérience sur la bronchoconstriction et la quantité d'effecteurs de la relaxation bronchique (récepteurs B2-AR).

A la fin de l'expérience décrite dans la Figure 30, les poumons des animaux des différents groupes ont été prélevés rapidement et congelés à -80°C afin d'éviter toute dégradation possibles des protéines. Nous avons ensuite préparé des homogénats de poumons selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes puis nous avons mesuré le

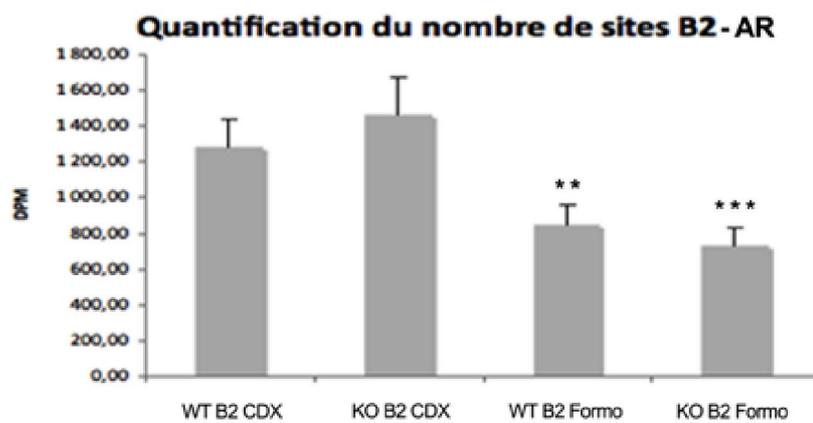
nombre de récepteurs bêta-adrénergiques présents dans les différents extraits. Pour ce faire, nous avons choisi un ligand radioactif non sélectif (capable de marquer les récepteurs B1-AR et B2-AR du poumon), le [3H] CGP-12 177, et l'avons utilisé à la concentration saturante de 1nM dans des expériences de liaison à l'équilibre. Nous avons déterminé la quantité de sites B1-AR par compétition en utilisant un antagoniste sélectif froid des récepteurs B2-AR (ICI 188 551), et la quantité de β 2-AR en utilisant un antagoniste sélectif froid des récepteurs B1-AR (CGP-20 712A). Nous avons préparé des membranes à partir d'un poumon de chaque animal utilisé lors de nos expériences de bronchodilatation et le nombre de sites B1-AR et B2-AR a été déterminé pour chaque animal individuellement.

Les résultats obtenus (figure 31) montrent que pour les deux génotypes KO et WT, le nombre total des récepteurs B-AR diminue significativement après un traitement aigu par une dose de 400 μ g/kg de formotérol (Figure 31A). De manière similaire, nous avons aussi remarqué qu'il y a une baisse significative du nombre des récepteurs B2-AR chez les deux génotypes, KO GASP1 et WT, après administration du formotérol (Figure 31B) alors que le nombre de récepteurs B1-AR ne diminue pas de manière significative (Figures 31C). Ceci indique qu'il y a une régulation négative des récepteurs B2-AR chez les souris qui ont reçues le formotérol par rapport à celle qui ont reçues du PBS dans les deux génotypes (WT et KO). D'après ce résultat, nous avons décidé d'étudier par la suite les conséquences d'un traitement chronique au formotérol sur le nombre de récepteurs B2-AR dans les poumons des souris KO GASP-1 et WT.

A



B



C

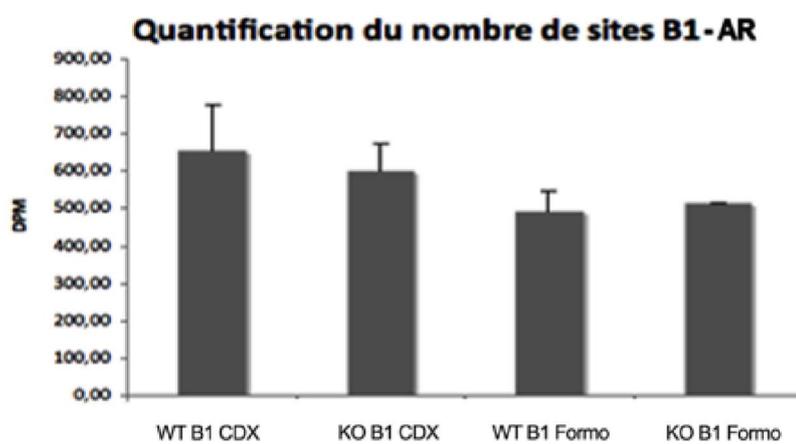


Figure 31 : Quantification du nombre de sites B-AR après l'administration aiguë du formotérol chez les souris WT et KO GASP1.

Le nombre de sites B-AR a été évalué par liaison à l'équilibre à partir d'homogénats de poumons d'animaux WT et KO GASP-1 ayant reçu une dose de formotérol (400 µg/kg) ou de solution contrôle (cyclodextrine dans du sérum physiologique) selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs obtenues + les déviations standards (n = 8-12 par groupe). L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad©, par un test t à deux voies, post test de bonferroni. ** signifie P<0,01 vs WT BT CDx ou KO BT CDx; *** signifie P<0,001 vs WT B2 CDx ou KO B2 CDx. CDx : cyclodextrine dans le sérum physiologique. Formo: formotérol

IV.A.6. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la réactivité bronchique chez les souris KO GASP1 par pléthysmographie

Afin d'évaluer les conséquences d'un traitement chronique au formotérol sur la réactivité bronchique chez les souris KO GASP1 et WT, Nous avons traité pendant 28 jours des souris KO-GASP-1 et WT avec 40µg/kg et 400 µg/kg par jour de formotérol, ou avec une solution saline comme contrôle. Après 28 jours de traitement, nous avons analysé la réactivité bronchique des animaux en réponse à l'administration de doses croissantes de métacholine (agoniste muscarinique aux effets broncho-constricteurs) à l'aide d'un pléthysmographe barométrique. Les animaux sont placés dans les chambres du pléthysmographe ce qui permet d'analyser la respiration des souris. Dans un premier temps, leur réactivité de base est mesurée, puis ils sont soumis à des nébulisations de 4 doses croissantes de métacholine espacées de 20 minutes. La constriction bronchique est appréciée par l'index Penh, qui prend en compte le pic d'inspiration et le pic d'expiration rapportés au temps d'expiration et d'inspiration (voir Figure 21). Les résultats sont présentés dans la Figure 32.

La réponse contractile des muscles lisses bronchiques est obtenue à partir de 0,1M de métacholine et elle atteint son maximum à 0,3M. On peut toutefois remarquer qu'après la 3^{ème} dose de MCh 0.3 M il n'y a aucune différence de Penh entre les souris WT et les souris KO qui ont reçue le PBS. Par contre, les analyses statistiques montrent qu'il y a une différence significative entre les souris KO GASP-1 et les souris WT quand elles sont traitées au formotérol. Ainsi, chez les WT, le traitement chronique au formotérol induit le développement d'une hyperactivité bronchique à la métacholine significative alors que chez les KO GASP1 cette hyperactivité est diminuée de manière statistiquement significative (p < 0,05). Ce résultat est valable pour les deux doses testées de formotérol (40µg/kg et 400 µg/kg,

respectivement Figure 32A et 32B). Il montre que chez la souris WT on peut observer le développement d'une hyperréactivité bronchique induite par l'administration chronique de formotérol alors que chez les souris KO GASP-1 ce phénomène est fortement atténué.

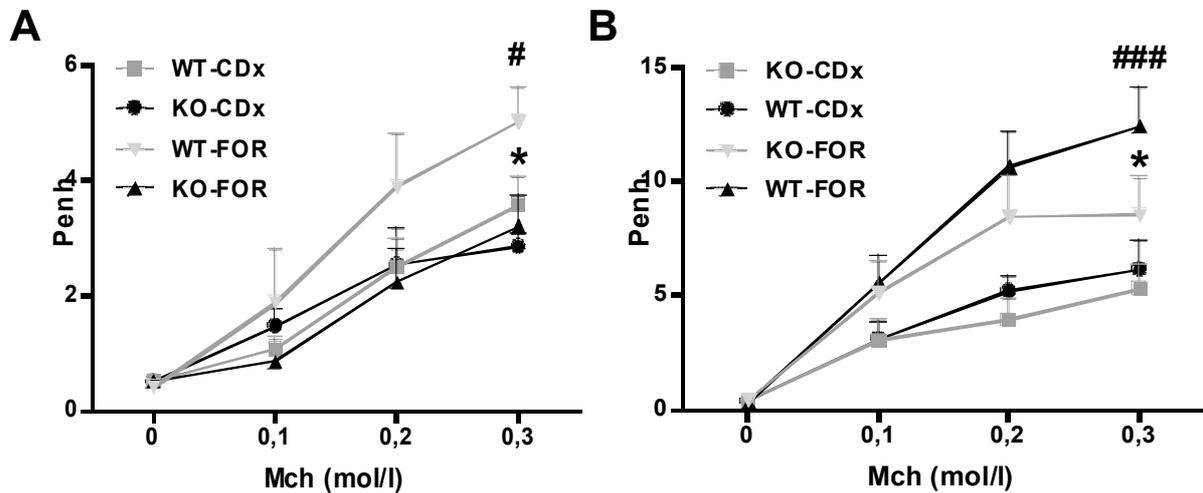


Figure 32. Effet de l'administration intranasale chronique (28 jours) du formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO GASP1.

La réactivité des voies aériennes (Penh) en réponse à des concentrations croissantes de métacholine (Mch) a été évaluée par pléthysmographie barométrique. **A.** Réactivité des voies aériennes à la métacholine après l'administration chronique de formotérol (40µg/kg ; n = 4 à 6 par groupe). **B.** Réactivité des voies aériennes à la métacholine après l'administration chronique de formotérol (400µg/kg ; n = 9 par groupe). Les valeurs correspondent aux moyennes + la déviation standard. # Indique $p \leq 0,05$ et ### indique $p \leq 0,001$ vs WT-CDx ; * indique $p \leq 0,05$ vs WT-FOR. CDx : Cyclodextrine dans sérum physiologique ; FOR : formotérol

IV.A.7. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la réactivité bronchique chez les souris KO GASP1 par la technique de l'oscillation forcée

La technique de pléthysmographie barométrique étant non invasive, Nous avons prolongé pendant 1 semaine les traitements au formotérol (400 µg/kg) des animaux utilisés dans l'expérience précédente, puis nous avons évalué la réactivité bronchique à la métacholine 24 heures après la dernière administration de formotérol avec la technique d'oscillation forcée (Flexivent ; voir Figure 19).

D'après les données de l'histogramme (Figure 33), il n'y a aucune différence entre les

souris WT et KO qui ont reçues le PBS ou le formotérol dans les conditions basales. De même, nos résultats montrent que la réactivité bronchique à la métacholine est similaire entre les souris KO GASP1 et WT quant elles sont traitées au PBS. Comme nous l'avons observé à l'aide du pléthysmographe, nos résultats montrent également que les souris WT ayant reçu un traitement chronique au formotérol présentent une hyperréactivité bronchique à la métacholine par rapport aux souris WT ayant reçu la solution saline. Enfin, on observe une diminution significative ($P < 0.01$) de l'effet de la métacholine dans le groupe de souris KO traitées de manière chronique au formotérol comparé avec le groupe de souris WT ayant reçu le même traitement, ce qui confirme le résultat obtenu avec le pléthysmographe.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent une atténuation importante de l'hyperréactivité bronchique induite par un traitement chronique au formotérol chez les souris KO GASP-1, suggérant une implication de cette protéine dans la mise en place des adaptations liées à la stimulation chronique des récepteurs B2AR.

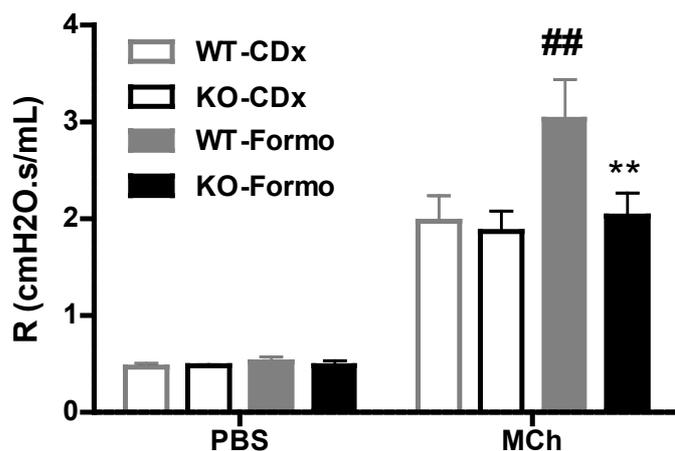


Figure 33. Effet de l'administration intranasale chronique du formotérol sur la réactivité des voies aériennes à la métacholine dans les souris WT et KO Gasp1.

La réactivité des voies aériennes (résistance, R) en réponse à une dose unique de métacholine (MCh ; 50mg/kg) a été évaluée par la technique du Flexivent[®] sur des animaux WT et KO GASP-1 ayant été traités au formotérol (400 µg/kg ou par une solution saline/cyclodextrine pendant 35 jours). Les histogrammes représentent les moyennes + les déviations standards (n = 5 à 9 par groupe). ## indique $p \leq 0,01$ vs WT-CDx ** indique $p \leq 0,01$ vs WT-FOR. CDx : Cyclodextrine dans sérum physiologique ; FOR : formotérol.

IV.A.8.Mesure de la tolérance induite par l'administration chronique de formotérol

Afin d'étudier également le développement de la tolérance aux effets bronchodilatateurs du formotérol induite par un traitement chronique avec ce composé, nous avons réalisé une expérience dans laquelle nous avons mesuré l'effet bronchodilatateur d'une dose de formotérol (à l'aide du Flexivent) chez des animaux WT et KO GASP-1 ayant été traités préalablement au formotérol 400 µg/kg pendant 35 jours. Dans les conditions basales, nos résultats montrent qu'il n'y a aucune différence entre les souris WT et KO qui ont reçues le PBS ou le formotérol en absence de la métacholine (Figure 34). Comme précédemment (Figure 33), on voit que l'effet bronchoconstricteur de la métacholine est similaire chez les souris WT et KO GASP-1 traitées au PBS. De même, l'effet bronchodilatateur d'une dose de formotérol chez des animaux traités par une solution saline pendant 35 jour est identique chez les KO GASP-1 et les WT. Enfin, on voit clairement que chez les animaux WT qui ont reçu du formotérol pendant 35 jours, l'effet bronchodilatateur d'une dose de formotérol est absent alors qu'il est toujours présent chez les KO GASP-1. Ces résultats indiquent qu'un traitement chronique au formotérol induit le développement d'une tolérance à ses effets bronchodilatateurs qui est absente chez les KO GASP-1.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que GASP-1 joue un rôle important à la fois dans le développement de l'hyperréactivité bronchique ainsi que de la tolérance aux effets bronchodilatateurs du formotérol induites par un traitement chronique avec ce même composé.

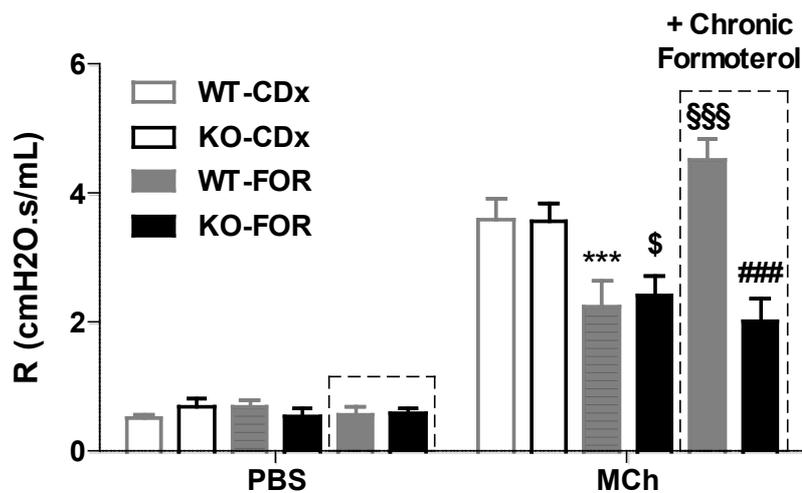


Figure 34 : Effet bronchodilatateur d'une dose de formotérol après un traitement chronique au formotérol dans les souris WT et KO GASP-1.

La réactivité des voies aériennes (résistance, R) en réponse à une dose unique de méta-choline (MCh, 50mg/kg) a été évaluée par la technique du Flexivent[®] avec ou sans administration préalable d'une dose de formotérol (400 µg/kg) sur des animaux WT et KO GASP-1 ayant été préalablement traités par du formotérol (400 µg/kg) ou par une solution saline/cyclodextrine pendant 35 jours. Les histogrammes représentent les moyennes + les déviations standards (n = 5 à 8 par groupe). *** Indique $p \leq 0,001$ vs groupe WT-CDx. \$ Indique $p \leq 0,05$ vs groupe KO-CDx. § § § indique $p \leq 0,001$ vs tout les groupe et # # # indique $p \leq 0,001$ vs WT-FOR pour le groupe avec traitement chronique formotérol. CDx : Cyclodextrine dans sérum physiologique ; FOR : formotérol.

IV.A.9. Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur le taux de collagène, l'activité de la myéloperoxydase et l'alpha actine musculaire lisse dans les poumons de souris WT et KO GASP-1.

Après 35 jours de traitement chronique au formotérol (400 µg/kg), Les poumons sont prélevés et on procède à la mesure du taux du collagène, de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et de l'alpha actine musculaire lisse dans les homogénats pulmonaires.

Concernant le taux du collagène, les résultats représentés dans la Figure 35 (A et B) montrent que ce taux est plus élevé chez les souris WT traitées au formotérol en comparaison avec les souris WT traitées à la solution saline ($p < 0,01$). Ce taux plus élevé pourrait refléter l'existence d'un remaniement du tissu bronchique induit par le formotérol comme cela a déjà

été suggéré. Par ailleurs, nos résultats montrent qu'il n'y a pas d'augmentation du taux de collagène chez les souris KO traitées au formotérol, suggérant que ce remaniement bronchique n'a pas eu lieu dans les souris KO GASP-1.

Nous n'avons pas observé de modification de l'activité de la MPO dans les différents échantillons (Figure 35C). Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas d'inflammation chez les animaux WT et KO GASP-1 traités au PBS et au formotérol pendant 35 jours.

Enfin, l'alpha actine musculaire lisse a été mesurée par ELISA dans les homogénats pulmonaires (Figure 35D). Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence entre les animaux KO GASP1 et WT traités ou pas par le formotérol, indiquant une absence de modification du muscle lisse bronchique chez ces animaux. .

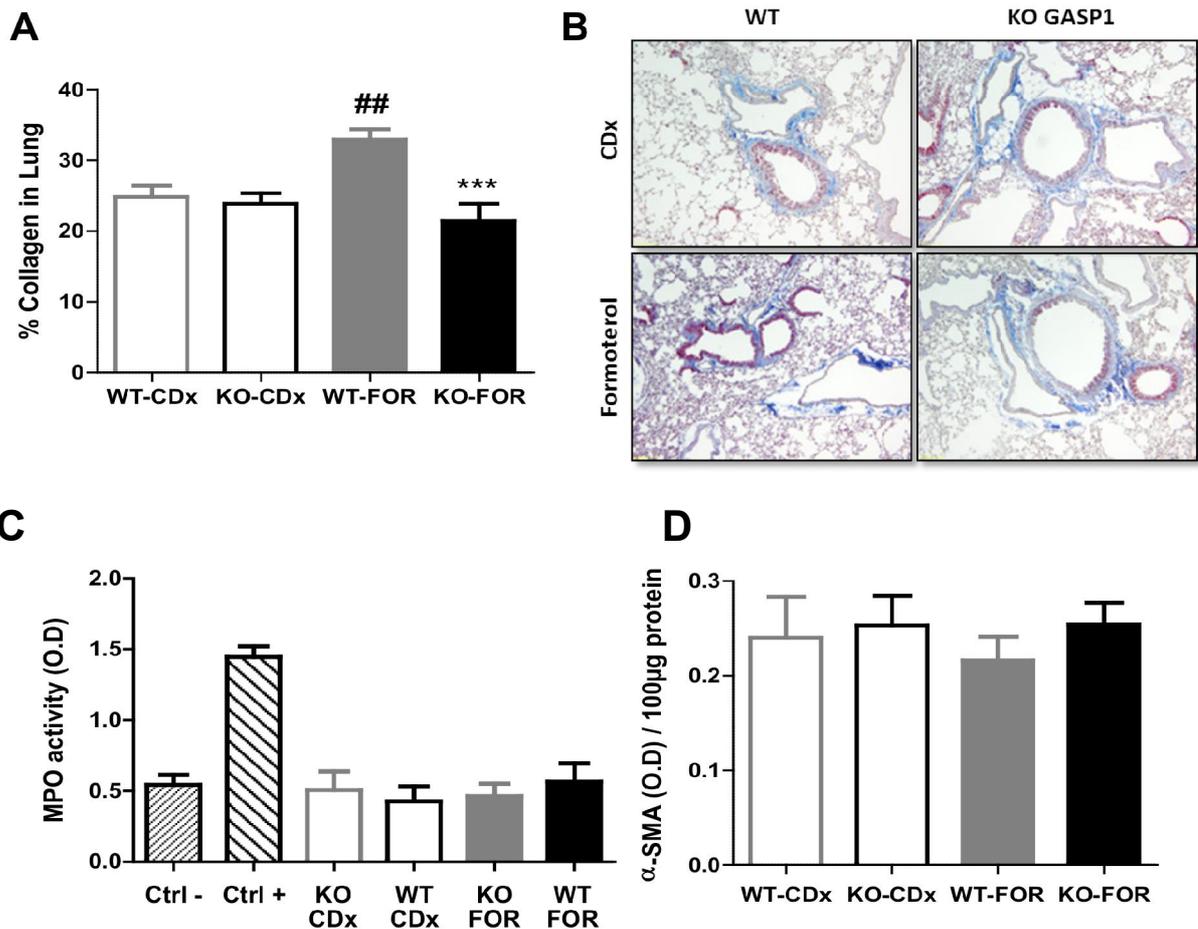


Figure 35. Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur le collagène, l'activité de la myelopéroxydase et l'alpha actine musculaire lisse dans les poumons des souris WT et KO GASP1.

Les mesures ont été réalisées sur les animaux WT et KO GASP-1 ayant été préalablement traités par du formotérol (400 µg/kg) ou par une solution saline/cyclodextrine pendant 35 jours. **A.** Pourcentage de collagène dans les homogénats de poumons des souris WT et KO GASP-1 mesuré par dosage colorimétrique. **B.** Coloration au colorant Trichrome de Masson de sections de poumons de souris WT et KO GASP-1 montrant le dépôt de collagène autour des bronches et des vaisseaux (grossissement x100). **C.** Mesure de l'activité MPO dans les homogénats de poumons de souris WT et KO GASP-1 par dosage colorimétrique (mesure indirecte de l'infiltration de neutrophiles dans les tissus). **D.** Mesure de l'alpha-actine musculaire lisse par ELISA dans les homogénats pulmonaires. Les histogrammes représentent les moyennes + les déviations standards (n = 5 à 8 par groupe). *** indique $p \leq 0,001$ vs WT-FOR ; ## $p \leq 0,01$ vs WT-CDx. CDx : Cyclodextrine dans sérum physiologique ; FOR : formotérol.

IV.A.10. Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur l'épaisseur de l'épithélium, le muscle lisse et le nombre de cellules dans les poumons chez les souris WT et KO GASP-1.

En parallèle des expériences présentés dans le paragraphe précédent, nous avons évalué, chez les animaux WT et KO GASP-1, les conséquences du traitement chronique au formotérol sur l'épaisseur de l'épithélium bronchique, la densité du muscle lisse bronchique et du tissu bronchique total ainsi que sur le nombre total de cellules. Pour ce faire, nous avons réalisé des sections des poumons des animaux WT et KO GASP-1, traités ou non au formotérol, que nous avons colorées de différentes manières afin de révéler les différents éléments du tissu. Les résultats sont regroupés dans la Figure 36. Nos observations, ont montré une absence de différence dans l'épaisseur de l'épithélium bronchique des animaux WT et KO GASP-1 traités ou non au formotérol (Figure 36A et B) ainsi qu'une absence de modification de la densité du muscle lisse bronchique (Figure 36C). A l'inverse, nous avons observé une légère augmentation de la densité globale du tissu et du nombre de cellules chez les animaux WT traités au formotérol qui est absente chez les animaux KO GASP-1 (Figure 36D et E). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent GASP-1 est impliqué dans la densification du tissu bronchique associé au traitement prolongé au formotérol mais que cette densification n'est pas due à une augmentation de la densité du muscle lisse bronchique, ni à une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium

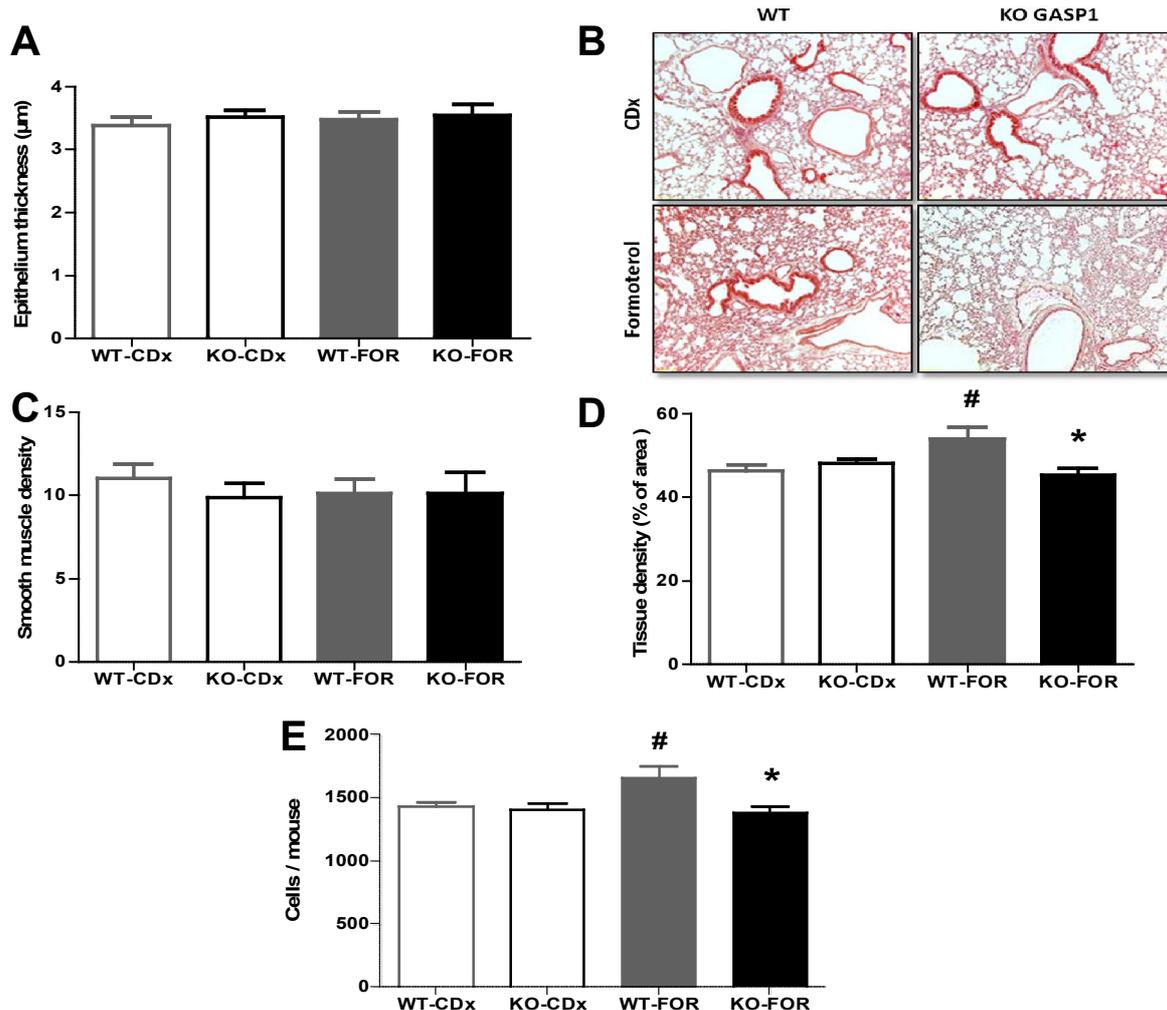


Figure 36 : Effet de l'administration intranasale chronique de formotérol sur l'épaisseur de l'épithélium, le muscle lisse et le nombre de cellules dans les poumons chez les souris WT et KO Gasp1.

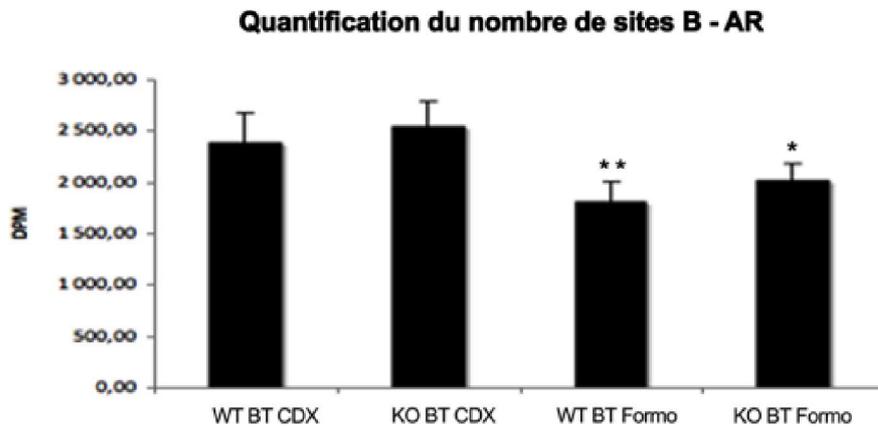
Les mesures ont été réalisées sur les animaux WT et KO GASP-1 ayant été préalablement traités par du formotérol (400 µg/kg) ou par une solution saline/cyclodextrine pendant 35 jours. **A.** L'épaisseur de l'épithélium a été mesurée sur des coupes colorées à l'Haematoxyline-Eosine. **B.** Photos représentatives de coupes colorées à l'Haematoxyline-Eosine (grossissement x100). **C.** La densité du muscle lisse a été mesurée sur des sections marquées par immunohistochimie avec des anticorps anti- α -actine. La surface du muscle lisse a été mesurée et rapportée au périmètre bronchique. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$. **D.** La Densité du tissu a été mesurée des coupes colorées à l'Haematoxyline-Eosine. La surface de tissu a été mesurée, rapportée à la surface de la section et exprimée en pourcentage de la surface totale. **E.** Le nombre de cellules a été mesuré sur des coupes colorées avec du DAPI. Les cellules ont été comptées sur deux images par sections. Les valeurs correspondent à des moyennes + la déviation standard ($n = 5$ à 8 par groupe). # indique $p \leq 0,05$ vs groupe WT-CDx et * indique $p \leq 0,05$ vs groupe WT-FOR. CDx : Cyclodextrine dans sérum physiologique ; FOR : formotérol.

IV.A.11. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur le nombre de récepteurs bêta-adrénergiques dans les poumons de souris WT et KO GASP-1.

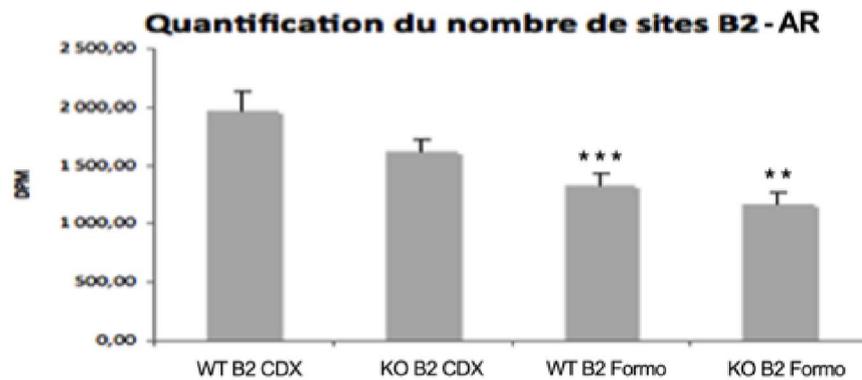
La quantification du nombre de récepteurs bêta-adrénergiques a été réalisée avec le même protocole que celui utilisé dans le cas du traitement aigu par le formotérol.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 37. Ils montrent que pour les deux génotypes KO et WT, le nombre total des récepteurs bêta-adrénergiques (B-AR) diminue après un traitement chronique par une dose quotidienne de 0,4 mg/kg de formotérol pendant 35 jours (Figure 37A). De manière similaire, nous avons observé une baisse significative du nombre des récepteurs B2-AR dans les deux génotypes après administration du formotérol. A l'inverse, il n'y a pas de variation significative du nombre de récepteurs B1-AR dans les animaux WT et KO GASP-1 suite à l'administration du formotérol (Figure 37C). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que conformément aux résultats du traitement aigu, il y a une régulation négative des récepteurs B2-AR après un traitement chronique au formotérol (35 jours) à la fois chez les souris WT et KO GASP-1. Ce phénomène présente une amplitude similaire dans les deux génotypes et ne semble donc pas être à l'origine du phénotype observé chez les KO GASP-1 au cours de cette étude.

A



B



C

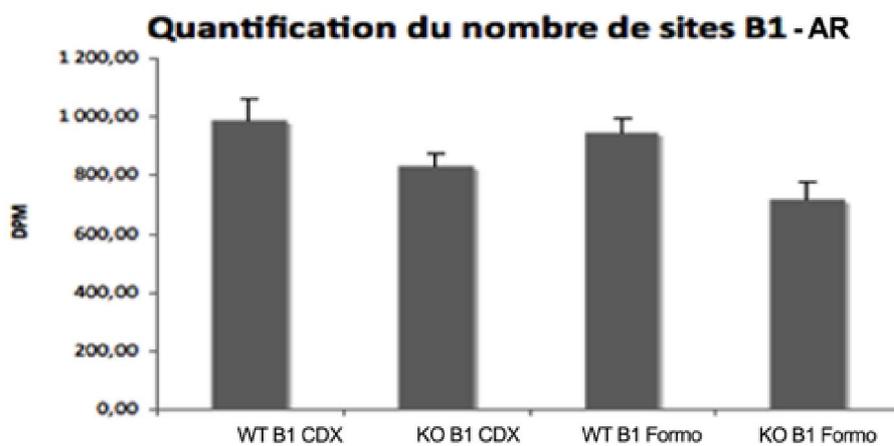


Figure 37 : Quantification du nombre de sites B-AR après l'administration chronique du formotérol chez les souris WT et KO GASP1.

Le nombre de sites B-AR a été évalué par liaison à l'équilibre à partir d'homogénats de poumons d'animaux WT et KO GASP-1 ayant reçu une dose quotidienne de formotérol (400 µg/kg, i.n.) pendant 35 jours ou la solution

contrôle (cyclodextrine dans du sérum physiologique) selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs obtenues + les déviations standards (n = 5 à 9 par groupe). L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad©, par un test t à deux voies, post test de bonferroni. ** signifie P<0,01 vs WT BT-AR CDx, KO BT-AR CDx ou KO B2 CDx; *** signifie P<0,001 vs WT B2 CDx. CDx : cyclodextrine dans le sérum physiologique ; Formo : formotérol.

IV.A.12. Effet d'un traitement chronique au formotérol sur la tension de la trachée isolée des souris WT et KO GASP-1

A la suite des expériences réalisées *in vivo*, nous avons voulu examiner si nous pouvions visualiser l'hyperréactivité bronchique induite par le formotérol directement sur la trachée de souris isolée. Nous avons réalisé ces expériences en collaboration avec l'équipe du Professeur Devillier (Upres EA 220, Suresnes) qui est spécialisée dans ce type de manipulations *ex vivo* sur la bronche isolée. Des souris WT et KO GASP-1 ont été traitées quotidiennement au formotérol pendant 35 jours puis leur trachée a été isolée afin d'évaluer leur réactivité à l'acétylcholine. Comme on peut le voir sur la Figure 38, la réactivité de la trachée des souris WT et KO GASP-1 à des doses d'acétylcholine allant de 10^{-8} à 3.10^{-3} M s'est avérée très similaire, que les animaux aient été traités ou non au préalable par le formotérol. La relaxation des trachées par une gamme de doses de formotérol a également été testée et nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes (données non montrées). Par conséquent, bien que ces préparations réagissent à un bronchoconstricteur (l'acétylcholine) et un bronchodilatateur (le formotérol), nous n'avons pas pu mettre en évidence les phénomènes d'hyperréactivité bronchique et de tolérance visualisés sur les animaux entiers. Ce résultat pourrait être lié au fait que nous n'avons pas pu travailler directement sur des bronches isolées (du fait de leur petite taille chez la souris) qui sont probablement le site principal de l'adaptation liée au traitement chronique avec le formotérol.

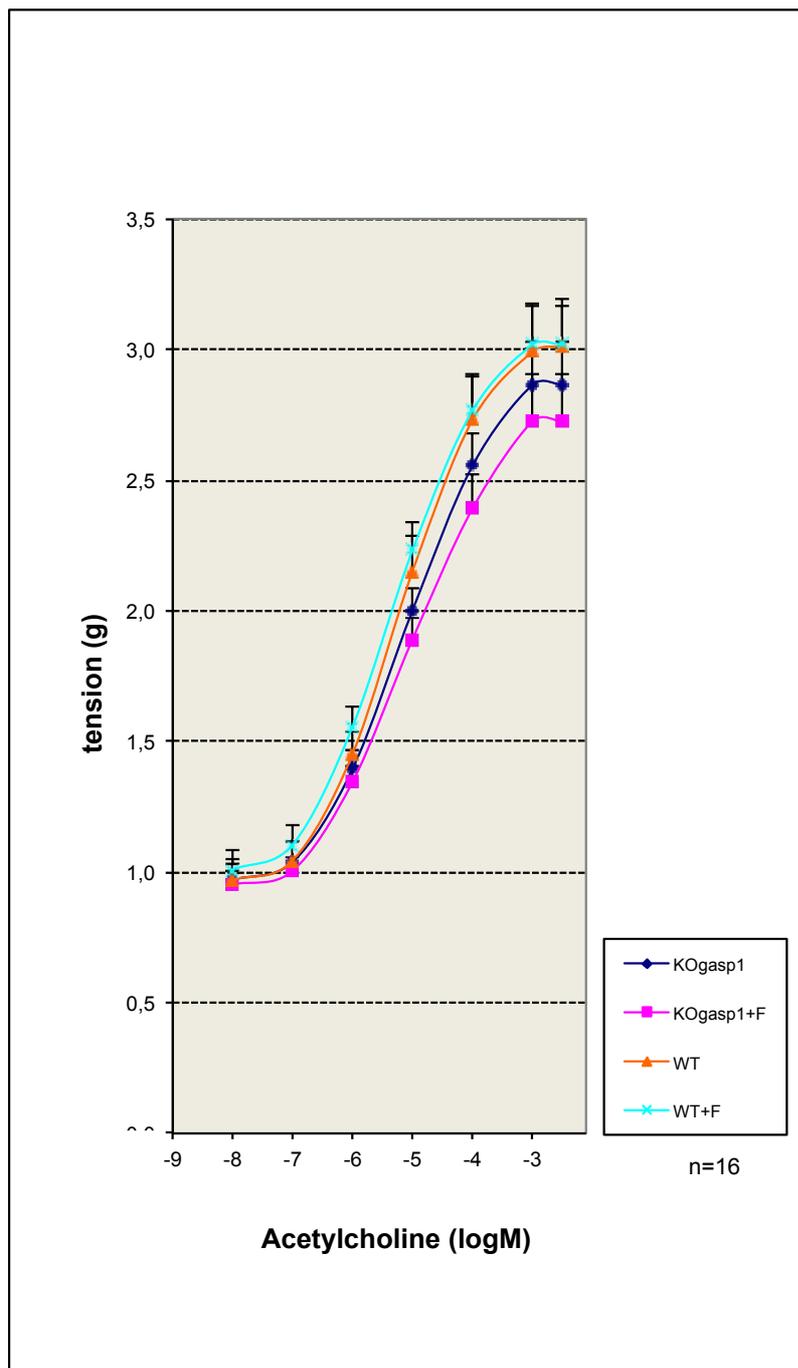


Figure 38 :Effet de l'acétylcholine sur la trachée isolée de souris WT et KO GASP-1 traitées de manière chronique au formotérol.

La réactivité des trachées isolées à différentes doses d'acétylcholine a été testée selon (Naline *et al.*, 1994), après traitement chronique au formotérol (400µg/kg, i.n.) ou à une solution saline de cyclodextrine pendant 35 jours. Les valeurs correspondent à des moyennes + les déviations standards (n = 16).

IV.A.13. Conclusion et discussion sur les résultats obtenus dans le modèle d'hyperréactivité bronchique induite par le formotérol chez les souris sauvages et KO GASP-1.

IV.A.13.1. Analyse de la réactivité bronchique chez les souris WT et KO-GASP-1 après un traitement chronique avec un agoniste B2-AR.

Les agonistes du récepteur B2-adrénergique sont des bronchodilatateurs puissants. Ils représentent des outils thérapeutiques majeurs dans le traitement de l'asthme. Dans les années 80-90, une recrudescence de mort par asthme a été observée; elle a été reliée à l'utilisation au long cours, en monothérapie, d'agonistes B2-adrénergiques en particuliers d'agonistes de longue durée d'action (LABA) alors commercialisés . Plus récemment, une méta-analyse incluant différents essais cliniques a confirmé que des patients traités pendant quatre semaines ou plus avec le formotérol (un agoniste type LABA) présentaient un risque significativement plus élevé d'effet secondaire grave et ce, que le formotérol soit associé ou non avec un glucocorticoïde (Cates & Cates, 2012). Ces problèmes ont été reliés à un remaniement du muscle lisse bronchique et au développement d'une hyper-réactivité bronchique directement générés par le formotérol.

Au cours de ce travail, nous avons mis au point et validé un modèle murin de traitement par les agonistes B2-adrénergiques chez la souris dans lequel sont étudiés i) les effets bronchodilatateurs aigus des agonistes bêta2-adrénergiques ainsi que ii) l'hyper-réactivité bronchique et le remaniement du muscle lisse bronchique associés à un traitement chronique (35 jours) par ces agonistes. Dans ce modèle, la réactivité bronchique des animaux est évaluée à l'aide de deux techniques différentes. L'une, consiste à mesurer la réactivité bronchique chez l'animal vigile à l'aide d'un pléthysmographe barométrique. L'autre, mesure directement la réactivité des voies aériennes chez l'animal anesthésié (technologie Flexivent®). Par ailleurs, nous avons associé ces mesures physiologiques à des mesures biochimiques et des coupes histologiques réalisées sur les poumons des animaux prélevés en fin d'expérience.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'effet bronchodilatateur aigu du formotérol n'est pas différent entre les souris sauvages et KO GASP-1. De manière intéressante, nous avons ensuite observé qu'un traitement chronique de 35 jours par le

formotérol administré par voie intranasale induit le développement d'une réactivité bronchique exagérée (par comparaison aux contrôles non-traités) chez les animaux sauvages mais pas chez les KO GASP-1. Par ailleurs, nous avons observé que le développement de l'hyperréactivité bronchique ne semble pas associé à une inflammation car nous n'avons pas observé d'état inflammatoire des poumons observés sur coupes histologique ainsi qu'aucune modification de l'activité de la myéloperoxidase dans les poumons des différents groupes.

A la suite de ces travaux *in vivo* nous avons voulu essayer de mettre en place un modèle *ex vivo* qui permettrait d'étudier plus en détail le phénomène observé sur l'animal entier. Nos essais sur la trachée de souris isolée se sont malheureusement avérés infructueux. Nous avons, par conséquent, opté pour une étude sur des cellules de muscle lisse bronchique humain dont les détails sont rapportés dans la suite du manuscrit (partie IV.B).

IV.A.13.2. Expression de GASP-1 et du récepteur B2-AR.

Nos résultats de Western blot et de liaison à l'équilibre suggèrent que GASP-1 et les récepteurs B2-AR sont bien co-exprimés dans le poumon et indiquent donc qu'il est pertinent de vouloir étudier le rôle de GASP-1 dans la modulation de l'activité des récepteurs B2-AR dans le contexte pulmonaire. Il reste cependant à faire la démonstration que ces deux partenaires sont bien co-exprimés dans les mêmes cellules. Cet aspect a été abordé dans la suite de ce travail.

Par ailleurs, nous avons observé dans nos Westerns blot sur les poumons de souris une faible expression de GASP-2 ainsi qu'une absence de régulation de cette expression à la suite du traitement au formotérol chez les souris WT et KO GASP-1. Ces résultats indiquent que la compensation éventuelle liée à l'expression dans le poumon de cette protéine très homologue à GASP-1 devrait-être relativement limitée. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le choix de notre modèle d'étude s'est avéré pertinent.

IV.A.13.3. Le nombres de sites du récepteur B2-AR chez les souris WT et KO GASP-1

Chez les WT et KO GASP-1 naïves, nous avons pu constater que la quantité de récepteurs β 2-AR est similaire. Après traitement aigu ou chronique avec un agoniste B2-AR, le niveau d'expression du récepteur B2-AR est significativement réduit de manière équivalente dans les deux génotypes. Le groupe du Dr Jennifer Whistler a préalablement

suggère que la protéine GASP-1 serait impliquée dans le tri des récepteurs couplés aux protéines G vers la dégradation lysosomale suite à leur stimulation prolongée (Whistler *et al.*, 2002; Bartlett *et al.*, 2005). Selon cette hypothèse, GASP-1 serait impliquée dans le développement de la tolérance suite à un traitement chronique avec un agoniste de RCPG. En effet, suite à sa stimulation, GASP-1 conduirait ce récepteur vers la dégradation et donc à une diminution du nombre de récepteurs disponibles à la membrane pour répondre à l'agoniste. Nos résultats indiquent que contrairement à cette hypothèse, GASP-1 ne semble pas impliqué de manière prépondérante dans la dégradation des récepteurs B2-AR suite à leur stimulation aiguë ou prolongée. Par conséquent, ce phénomène ne semble pas être à l'origine de l'absence d'hyperréactivité bronchique et de tolérance observées chez les KO GASP-1 à la suite du traitement prolongé au formotérol.

IV.B. Vers la mise en place d'un modèle cellulaire pour analyser le rôle de la protéine GASP1 dans l'activation prolongée du récepteur bêta-2 adrénergiques

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que l'effet bronchodilatateur aigu du formotérol n'est pas différent entre les souris sauvages et KO GASP-1. De manière intéressante, nous avons ensuite observé qu'un traitement chronique de 35 jours par le formotérol administré par voie intranasale induit le développement d'une réactivité bronchique exagérée (par comparaison aux contrôles non-traités) chez les animaux sauvages mais pas chez les KO GASP-1. Par ailleurs, nous avons observé que le développement de cette hyper-réactivité bronchique était corrélé à une augmentation du niveau de collagène dans les poumons des souris sauvages qui n'est pas observée chez les KO GASP-1. Ce résultat est confirmé par l'observation de coupes histologiques. Nos résultats de Western blot et de liaison à l'équilibre suggèrent que GASP-1 et les récepteurs B2-AR sont bien co-exprimés dans le poumon et indiquent donc qu'il est pertinent de vouloir étudier le rôle de GASP-1 dans la modulation de l'activité des récepteurs B2-AR dans le contexte pulmonaire.

Dans la suite de ce travail, nous avons voulu mettre en place un système cellulaire pour analyser le rôle de la protéine GASP1 dans l'activation prolongée des récepteurs bêta-2 adrénergiques en utilisant des cultures primaires de cellules du muscle lisse bronchique (cellules CML). Ces cellules sont issues des parties saines de biopsies de poumons de patients. La mise en culture de fragments de poumons dans un milieu approprié permet

d'obtenir après quelques semaines des cellules musculaires lisses qui se divisent et qui pourront être utilisées jusqu'au huitième passage pour réaliser nos expériences. Au delà de cette limite on considère que les cellules ont tendance à perdre leurs caractéristiques de cellules de muscle lisse (Freund-Michel *et al.*, 2002).

IV.B.1. Expression des protéines GASP-1, GASP-2 et du récepteur B2-AR dans les cellules primaires de muscle lisse bronchique humain (CML)

IV.B.1.1. Expression de la protéine GASP-1

Dans un premier temps nous avons voulu examiner la présence de GASP-1 et GASP-2 dans des cellules primaires de muscle lisse bronchique humain (CML). Pour ce faire, nous avons préparé des extraits protéiques à partir de ces cellules cultivées en présence de 10 ou 0,3% de sérum de veau fœtal (FCS). La culture en présence de faible quantité de sérum renforce les caractéristiques de muscle lisse de ces cellules. Nous avons fait migrer 20 µg de protéines de chaque échantillon sur un gel 8% acryl/bisacrylamide, puis nous avons réalisé un Western Blot avec un anticorps polyclonal anti-GASP-1 qui reconnaît également GASP-2. Nous avons fait migrer également comme témoin positif un extrait cellulaire de lignée SHSY-5Y (neuroblastome humain) qui exprime les protéines GASP-1 et GASP-2 en abondance. Nous avons, par ailleurs, réalisé un second Western Blot avec un anticorps polyclonal anti-GASP-2 qui reconnaît GASP-2 mais pas GASP-1. Les résultats sont présentés dans la Figure 40.

Comme on peut le voir, dans la piste 3 correspondant aux SH5Y-5Y, on distingue deux bandes immunoréactives principales d'un poids moléculaire apparent d'environ 190 et 100 kDa correspondant respectivement à GASP-1 et GASP-2 (Figure 39, gel du haut). Dans les pistes 1 et 2 correspondant à deux extraits de cellules CML cultivées en présence de sérum de veau fœtal (FCS) 10 ou 0.3%, on constate également la présence de deux bandes immunoréactives majoritaires de taille équivalente à celles présentes dans l'extrait de cellules SHSY-5Y. Ces deux bandes correspondent très probablement à GASP-1 et GASP-2.

L'anticorps polyclonal anti-GASP-2 ne reconnaît, quand à lui, que GASP-2 dans les extraits de cellules SHSY-5Y ainsi dans les extraits de CML (Figure 39, gel du bas). Dans l'ensemble, ces données indiquent la présence des protéines GASP-1 et GASP-2 dans les CML.

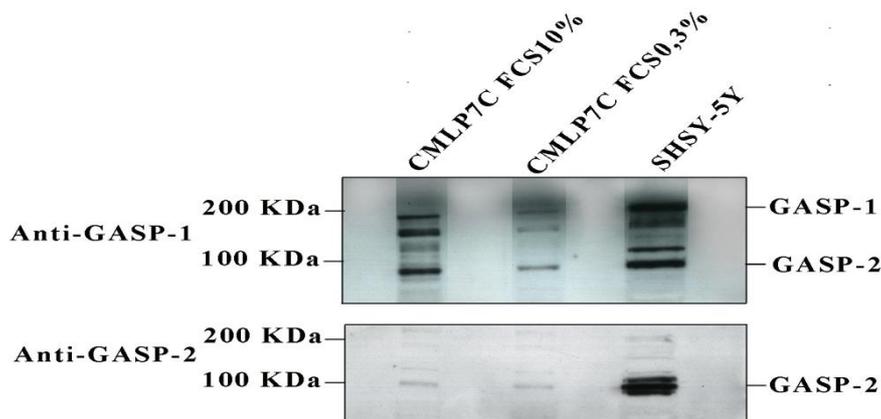


Figure 39 : Mise en évidence de l'expression endogène de GASP-1 et GASP-2 dans les CML par Western blot.

Un extrait cellulaire de lignée SHSY-5Y est placé dans le puits 3 comme témoin positif. L'anticorps reconnaît une protéine de 190-kDa correspondant à GASP-1. Dans les puits 1 et 2, l'anticorps reconnaît une protéine correspondant à GASP-1 dans les deux extraits de cellules CML 7C FCS 10% et CML 7C FCS 0.3%. Dans les puits 1 et 2, l'anticorps reconnaît une protéine correspondant à GASP-2 dans les deux extraits de cellules CML 7C FCS 10% et CML 7C FCS 0.3%. Les cellules utilisées dans cette expérience sont issues d'un seul patient (7C). FCS : Sérum de veau fœtal

IV.B.1.2. Expression du récepteur B2-AR dans les CML

Nous avons ensuite voulu examiner la présence du récepteur B2-AR dans les CML. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de liaison à l'équilibre sur ces cellules avec un ligand radioactif non sélectif (capable de marquer les récepteurs B1-AR et B2-AR), le [³H] CGP 12 177. Nous l'avons utilisé à la concentration saturante de 1nM afin de saturer l'ensemble des sites B1-AR et B2-AR. Nous avons déterminé la quantité de sites β1-AR par compétition en utilisant un antagoniste sélectif froid des récepteurs β 2-AR (ICI 188 551), et la quantité de β2-AR en utilisant un antagoniste sélectif froid des récepteurs β1-AR (CGP 20 712A). Les résultats obtenus avec trois quantités de cellules issues du même patient que celui utilisé pour les Western Blot ayant permis de révéler la présence de GASP-1 sont présentés dans la Figure 40. Les résultats obtenus avec 250000, 500000 et 1000000 de cellules indiquent clairement que les CML issues de ce patient expriment à la fois les récepteurs B2-

AR et B1-AR.

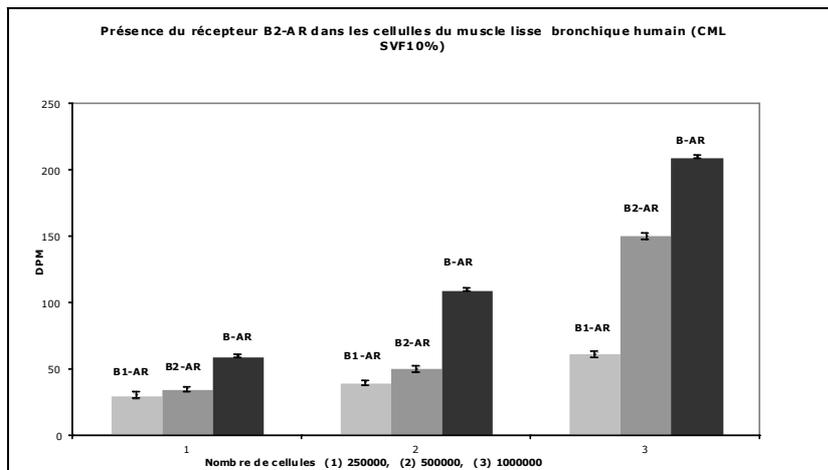


Figure 40 : Expression endogène des récepteurs B1- et B2-AR dans les CML

Les CML issues du patient 7C ont été cultivées en présence de 10% de FCS. Les membranes de ces cellules ont été préparées selon le protocole indiqué dans Matériel et Méthodes. Les expériences de liaison à l'équilibre ont été réalisées en duplicats avec des membranes provenant respectivement de 250000, 500000 et 1000000 de cellules.

IV.B.2. Tests de fonctionnalité du récepteur B2-adrénergique des cellules primaires CML : activation de l'adénylate cyclase et production d'AMPC.

Dans cette étude, nous avons voulu vérifier que le récepteur B2-AR présent à la surface des CML était bien fonctionnel. Pour ce faire, nous avons mesuré la capacité du formotérol à stimuler la production d'AMP cyclique dans ces cellules. Par ailleurs, nous avons utilisé comme contrôle positif les cellules HEK293 qui expriment de manière endogène les récepteurs B2-AR (Michel *et al.*, 2014). Ces expériences ont été réalisées à l'aide d'un kit de détection Lance Ultra cAMP (voir Matériel et Méthodes) qui permet d'atteindre un niveau de sensibilité compatible avec des dosages sur des cellules en faible nombre (quelques milliers de cellules). Les résultats présentés dans la figure 41, montrent que dans les CML, le formotérol à une concentration de 10 μ M stimule la production d'AMP cyclique d'une manière similaire à la forskoline (molécule activatrice de l'adénylate cyclase).

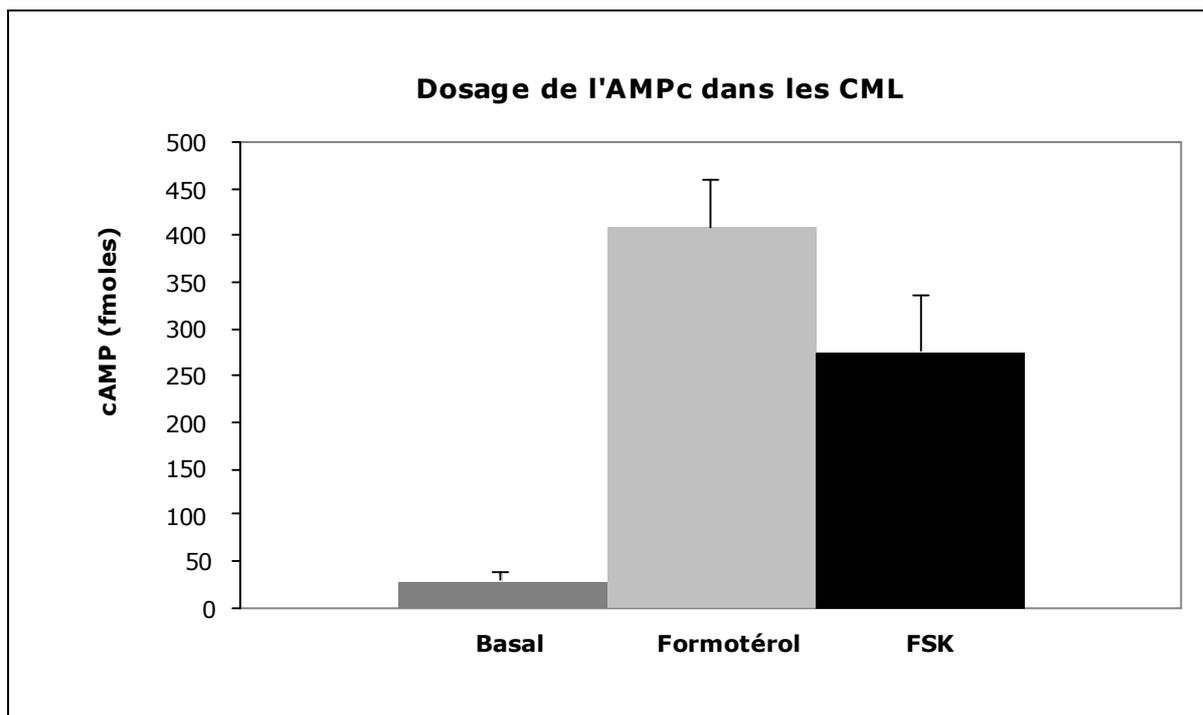


Figure 41: Production d'AMPc par les CML stimulées avec le formotérol ou la forskoline

Les CML (Patient 7C 10% SVF, 2000 cellules par point) ont été traitées avec le formotérol (10 μ M) ou la forskoline (10 μ M) pendant 20 min. les valeurs correspondent à la moyenne \pm la déviation standard (n = 3).

IV.B.3. Evaluation de la capacité du récepteur B2-AR des CML à activer la voie des MAP kinases

Afin de compléter la caractérisation du récepteur B2-AR présent sur les cellules de muscle lisse humain, nous avons voulu évaluer la capacité du formotérol à stimuler la voie des MAP kinases comme cela a déjà été décrit (Nino *et al.*, 2009). Dans ce travail, il a été montré que les agonistes de ce récepteur, en particulier l'isoprotérénol et le salmétérol, sont capable de stimuler la phosphorylation des protéines ERK1/2 après quelques minutes de traitement avec ces deux agonistes (Nino *et al.*, 2009). Nous avons réalisé une expérience similaire avec le formotérol sur des CML et en parallèle nous avons testé comme contrôle positif des cellules HEK293 qui expriment le récepteur B2-AR de manière endogène. Les résultats sont présentés dans la Figure 42A. Comme on peut le voir dans le panel de gauche, dans les HEK293, 5 à 10 minutes de traitement avec le formotérol induit une forte stimulation

de la phosphorylation des protéines ERK1/2, ce qui indique que cet agoniste stimule bien cette voie de signalisation via le récepteur B2-AR et que tous nos réactifs sont corrects (agonistes, anticorps etc.). A l'inverse avec les CML du patient 7C (Figure 42A, panel de droite), dans les mêmes conditions, nous n'avons pas observé de stimulation de la phosphorylation des protéines ERK1/2. Afin de vérifier l'état physiologique des CML que nous avons utilisé, nous avons testé dans un deuxième temps, la capacité d'un ligand d'un récepteur à tyrosine-kinase, le NGF, à stimuler la phosphorylation de ERK1/2 dans ces cellules. En effet, la voie des MAP kinases est la voie principale utilisée par ce type de récepteur pour stimuler la division des cellules et il a déjà été montré que dans les CML le NGF stimule cette voie via son récepteur TrkA (Freund-Michel *et al.*, 2006). Dans l'expérience que nous avons réalisé au laboratoire avec les CML issues du patient 7C (Figure 42B), nous n'avons pas observé d'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 ni avec le NGF (panel de droite), ni avec le formotérol (panel de gauche) à aucun des temps évalués.

Ces résultats indiquent soit que nous n'étions pas dans les bonnes conditions pour effectuer cet essai (temps de sevrage en sérum des cellules, tampon utilisé), soit que ces cellules étaient dans un état physiologiques tel que l'on ne pouvait pas visualiser la stimulation de cette voie de signalisation.

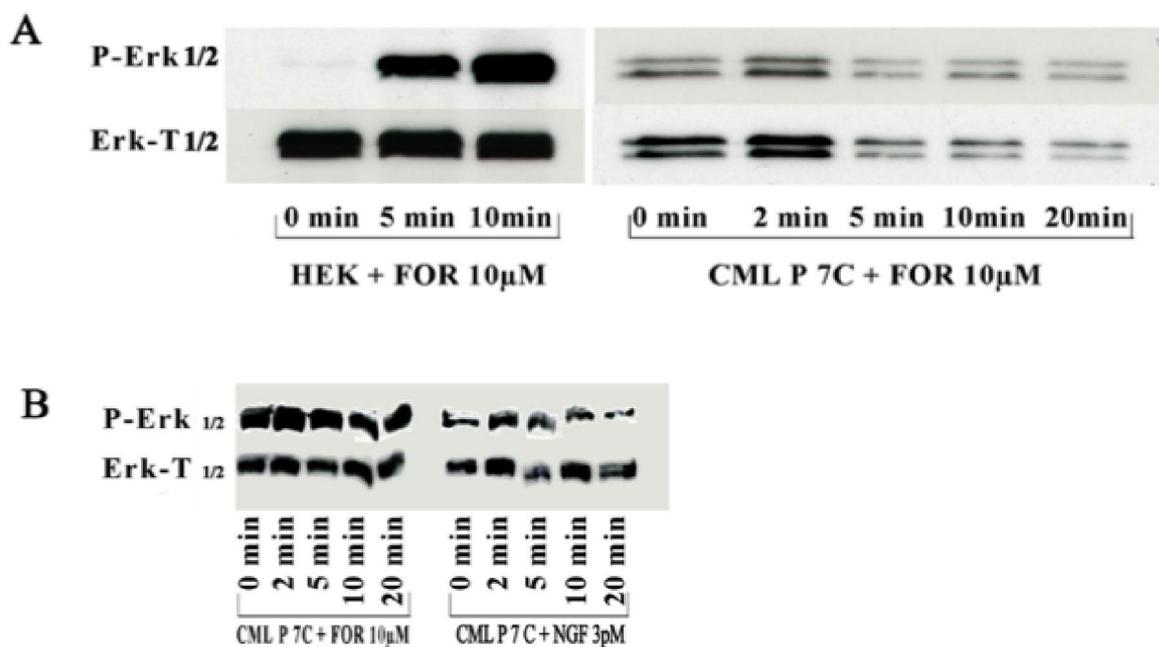


Figure 42 : Activation de la voie des MAP kinases par le formotérol dans les CML

Le degré de phosphorylation des protéines ERK1/2 dans les cellules HEK293 (A) et CML (A et B) a été évalué selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes. Les cellules ont été traitées au formotérol (10 μ M) ou au NGF (3 μ M) pendant les temps indiqués.

IV.B.4. Effet de l'activation prolongée du récepteur B2-AR sur les réponses calciques des récepteurs couplés aux protéines de type Gq dans les CML

Dans une publication récente (Yang *et al.*, 2011), il a été montré que la stimulation prolongée des CML avec l'agoniste des récepteurs B-AR isoprotérénol potentialise la réponse calcique de plusieurs récepteurs couplés aux protéines Gq exprimés de manière endogène dans ces cellules. Ce phénomène pourrait fournir une base moléculaire du phénomène d'hyperréactivité bronchique induit par un traitement chronique avec un agoniste B2-AR que nous avons observé chez la souris. Comme on peut le voir dans la Figure 43 (issue de cet article), des CML prétraités à l'isoprotérénol pendant 48 heures semble présenter une réactivité plus importante à plusieurs agonistes de récepteurs couplés à Gq, dont la libération de calcium intracellulaire et la voie de signalisation principale (voir introduction). Ce traitement n'a pas augmenté les quantités des récepteurs ni l'expression des protéines G ou des

effecteurs secondaires (phospholipase C β). En revanche, les agonistes B-AR semblent diminuer l'expression du régulateur de la signalisation 5 (RGS5), qui est un « inhibiteur » de l'activité des protéines G (voir introduction).

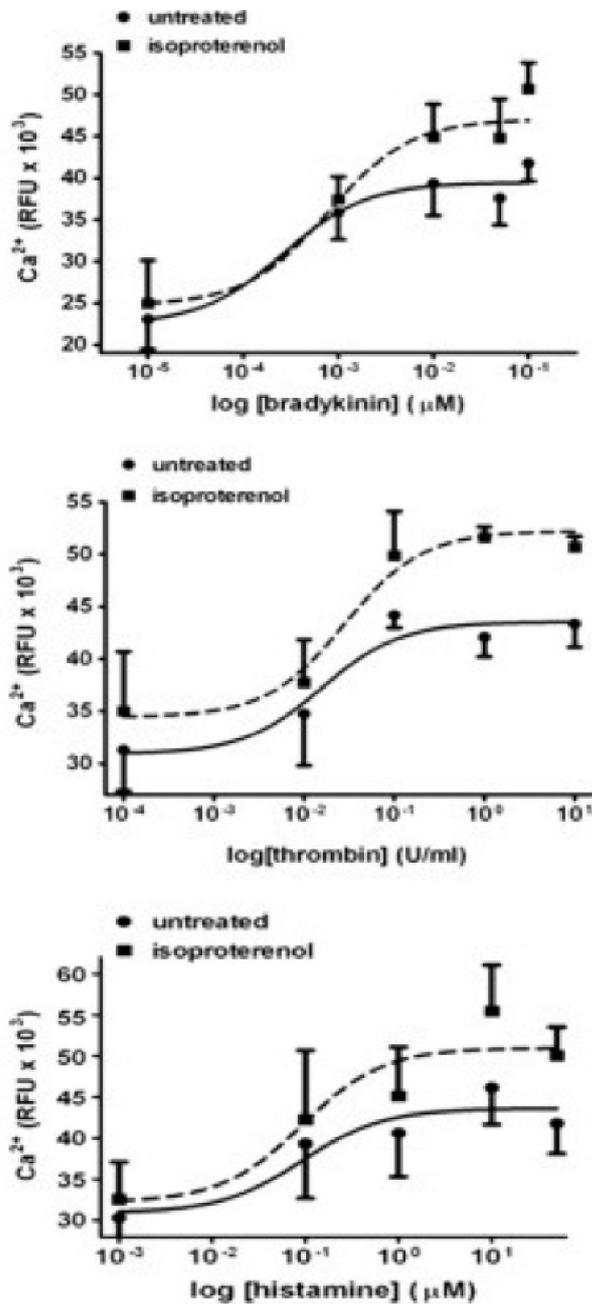


Figure :43 Comparaison de la concentration de calcium intracellulaire dans les CML après activation par la bradykinine ,la thrombine ou l’histamine

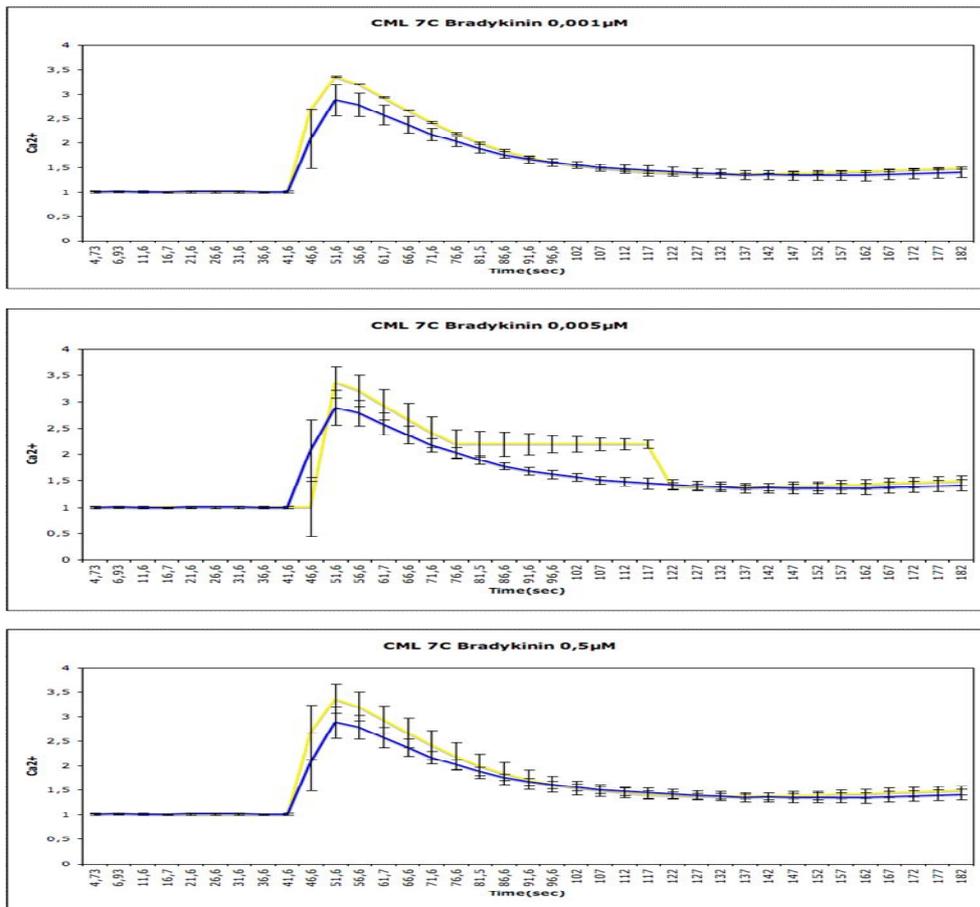
Cette figure est issue de l'article de Yang *et al.*, (2011). Les CML ont été traitées avec l'isoprotérénol (0.5 μ M) pendant 48 heures puis la capacité de la bradykinine, de la thrombine et de l'histamine à stimuler la libération de calcium intracellulaire a été mesurée à l'aide d'une sonde calcique fluorescente (FLIPR calcium 3 de chez Molecular Devices).

Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire les résultats de (Yang *et al.*, 2011) afin d'évaluer, dans un deuxième temps, l'implication de la protéine GASP-1 dans la potentialisation des réponses des récepteurs couplés à Gq par l'activation prolongée des récepteurs β 2-AR.

Dans cette étude, nous avons exposé les CML issue du patient 7C au formotérol (10 μ M) pendant 48 h avant de tester la libération de calcium intracellulaire induite par deux agonistes différents, la thrombine et la bradykinine. La quantité du calcium intracellulaire libéré après activation a été mesurée par fluorimétrie (voir Matériel et Méthodes). Une partie des données recueillies sont représentées dans la Figure 44 qui montre la cinétique de variation de la concentration intracellulaire de calcium avant ou après l'addition de chacun des deux agonistes après exposition ou non des cellules au formotérol. Concernant la bradykinine, nous avons vu que des doses allant de 0.001 μ M à 0.5 μ M stimulent de la même manière la libération de calcium intracellulaire que les cellules aient été préalablement traitées ou non au formotérol (Figure 44A). De même, nous avons observé que 50 unités de thrombine produisent également des effets similaires que les cellules soient prétraitées ou non au formotérol (Figure 44B). Dans le cas de la thrombine, on peut même observer un effet légèrement inférieur (quoique non significatif) lorsque les cellules ont été prétraitées au formotérol. Les concentrations inférieures de thrombine testées (jusqu'à 0.05 unités) ont donné des résultats similaires (données non montrées).

En conclusion, bien que nous ayons clairement pu montrer l'induction d'une réponse calcique par des agonistes (bradykinine, thrombine) de récepteurs couplés à la protéine Gq dans les CML issues du patient 7C au cours de cette étude, nous n'avons pas pu reproduire la potentialisation de cette réponse par un prétraitement de 48 hrs avec le formotérol telle qu'elle a été montrée avec l'isoprotérénol par Yang et collaborateurs (Yang *et al.*, 2011). Cette différence pourrait être due au fait que l'isoprotérénol est un agoniste des récepteurs B1- et B2-AR alors que le formotérol est un agoniste sélectif du récepteur B2-AR. En effet, bien que cela nécessite vérification, nos expériences de binding suggèrent que les CML pourraient exprimer un peu de récepteur B1AR (voir chapitre précédent). Néanmoins, nous avons clairement montré que le formotérol chez l'animal induit le développement d'une hyperréactivité bronchique et donc si le phénomène observé par Yang et collaborateur était à l'origine du développement de l'hyperréactivité bronchique induite par les agonistes B2-AR, nous devrions l'observer avec le fomotérol.

A



B

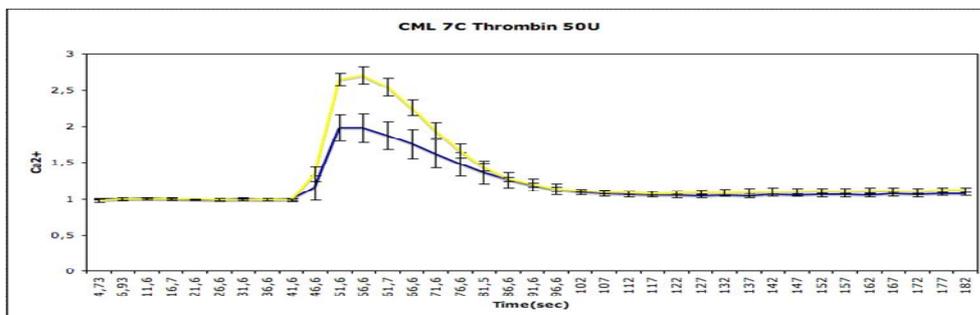


Figure 44 : Réponse calcique des CML à la bradykinine et à la thrombine avec ou sans prétraitement au formotérol.

Mesure de la libération de calcium intracellulaire induite par la bradykinine (A) ou la thrombine (B) dans les CML après une exposition au formotérol (lignes bleues) ou non (lignes jaunes). Les cellules ont été traitées avec le formotérol (10 μ M) pendant 48 heures puis ont été incubées avec les concentrations indiquées de la bradykinine ou de la thrombine. Les concentrations de calcium intracellulaire ont été mesurées par fluorimétrie à l'aide de la sonde Fluo-4 (voir Matériel et Méthodes).

IV.B.5. Optimisation de la transfection des cellules primaires CML

En parallèle des expériences précédentes, nous avons tenté d'optimiser les conditions de transfection des CML afin de pouvoir moduler l'expression de GASP-1 dans ces cellules soit en diminuant son expression en transfectant des siRNA ou des shRNA soit en surexprimant GASP-1 à l'aide d'un vecteur eucaryote supérieur de type pcDNA3. Cela permettrait d'étudier l'effet de GASP-1 sur les voies de signalisation et de voir si on peut corréler les résultats avec les données *in vivo* à savoir l'absence du développement d'une hyperactivité à la méthacholine après administration chronique d'un agoniste B2-AR dans les souris n'exprimant pas GASP-1. Les CML sont difficiles à transfecter par les méthodes classiques comme c'est le cas pour beaucoup de lignées cellulaires primaires. Nous avons donc opté pour une technique alliant la transfection chimique et l'électroporation afin d'augmenter nos chances de succès. En effet, l'électroporateur commercialisé par la société Lonza a déjà été largement décrit pour permettre un fort taux de transfection de nombreuses cellules primaires avec un taux de survie important.

La Figure 45 résume les meilleurs résultats que nous avons pu obtenir avec le plasmide contrôle du kit pmaxGFP, qui permet l'expression de la GFP (Figure 45A), le pcDNA-bêta 14.3.3-mYFP, qui est un contrôle déjà utilisé au laboratoire qui permet l'expression de la protéine bêta14.3.3 fusionnée à la YFP (Figure 45B), et le pcDNA3-YFP-GASP-1 qui permet l'expression de la protéine GASP-1 fusionnée à la YFP (Figure 45C). Comme, on peut le voir dans la Figure 45A, la transfection du pmaxGFP, dans les conditions optimales que nous avons identifiées pour les CML, permet une expression de la GFP dans la quasi totalité des cellules (comparer la photo en contraste de phase à gauche et en fluorescence à droite). Par contre, le nombre de cellules transfectées à l'aide de notre contrôle maison, pcDNA-bêta 14.3.3-mYFP, préparé exactement dans les mêmes conditions que le contrôle du kit, donne un niveau de transfection beaucoup plus faible (Figure 45B). Ce niveau s'est avéré encore plus bas lorsque que nous avons testé la construction pcDNA3-YFP-GASP-1 avec moins de 1% de cellules transfectées.

En conclusion, bien que nous ayons identifié de très bonnes conditions de transfection pour les CML à l'aide du contrôle positif du kit de transfection, elles ne sont toutes fois pas adaptées à la transfection de plasmides permettant l'expression de protéines plus grosses et plus complexes. En particulier, la construction permettant l'expression de la protéine GASP-1 (1395 aa) fusionnée à la YFP (env 300 aa) semble particulièrement difficile à transfecter de manière efficace et compatible avec les mesures biochimiques envisagées par la suite.

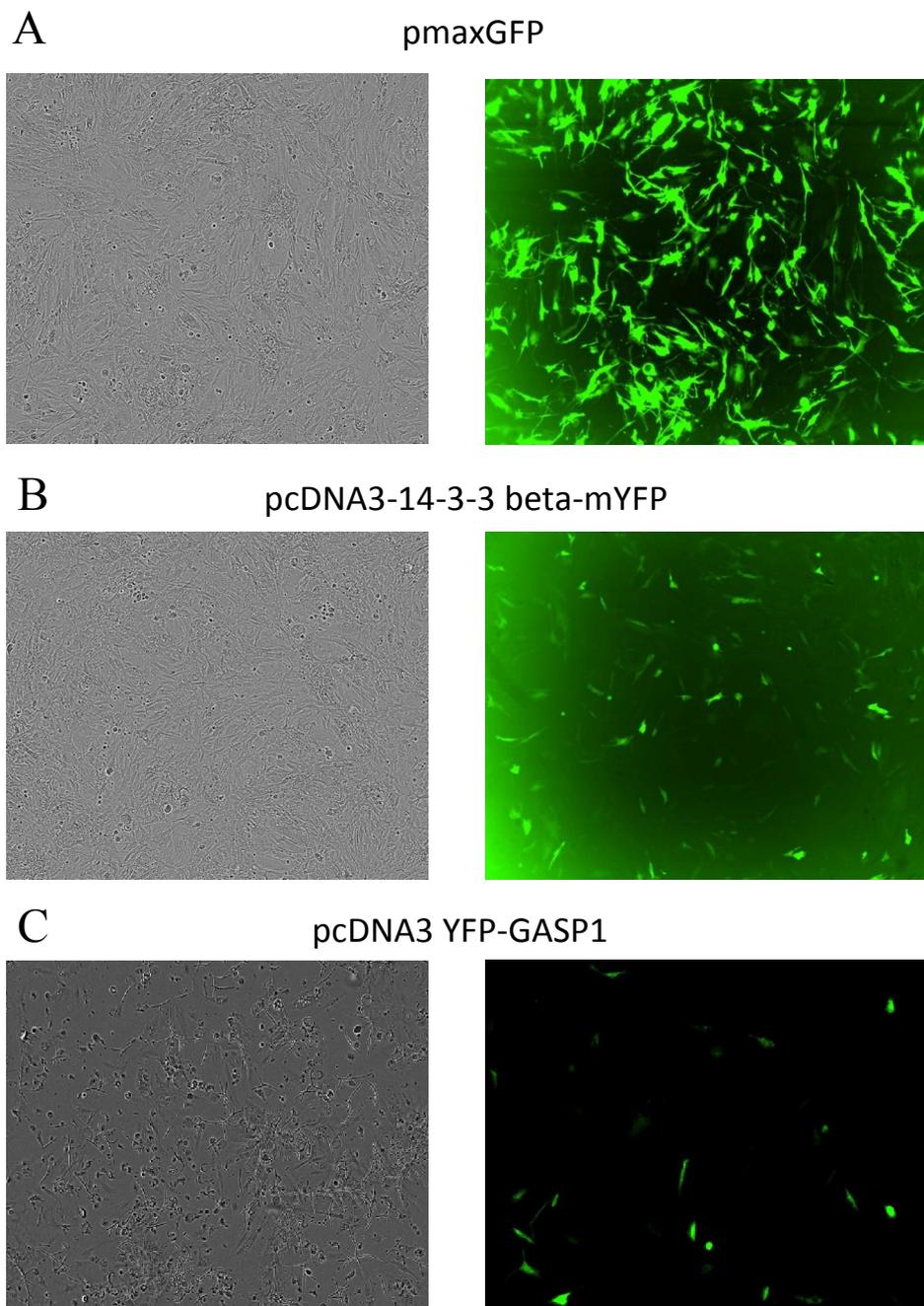


Figure 45: Cellules CML transfectées avec les plasmides pmaxGFP, pcDNA3-14-3-3-mYFP et pcDNA3-YFP-GASP-1.

Les CML ont été transfectées par les vecteurs pmaxGFP (A), pcDNA3-14-3-3-mYFP (B) et pcDNA3-YFP-GASP-1 (C) à l'aide du Nucleofector 4D selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Le même puits a été photographié en contraste de phase pour visualiser les cellules (panels de gauche) et en fluorescence pour visualiser la GFP ou la YFP (panels de droite).

IV.B.6. Conclusion et discussion de la partie sur la mise au point du système cellulaire.

Dans cette partie du travail, nous avons voulu mettre en place un système cellulaire qui nous permettrait d'analyser le rôle de la protéine GASP1 dans l'activation prolongée des récepteurs bêta-2 adrénergiques. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules du muscle lisse bronchique humain qui sont considérées comme le site d'action principal pour l'effet bronchodilatateur des agonistes bêta2-adrénergiques. Dans un premier temps, nous avons montré que GASP-1 et le récepteur B2-AR sont bien exprimés dans ces cellules. Nous avons ensuite montré que le récepteur B2-AR est fonctionnel bien que nous n'ayons pas pu visualiser la stimulation de la voie des MAP kinase par le formotérol dans ces cellules.

Nous avons ensuite, tenter de reproduire les observations récentes réalisées par Yang et collaborateurs (Yang *et al.*, 2011) montrant que dans les CML, la stimulation prolongée avec un agoniste bêta-adrénergique induit une potentialisation de la réponse calcique associée à la stimulation des récepteurs couplés à la protéine Gq dans ces cellules. L'objectif étant d'étudier l'implication de GASP-1 dans ce phénomène. Nous n'avons malheureusement pas pu reproduire ces observations. Ce résultat négatif pourrait être du à des problèmes techniques ou au fait que nous ayons utilisé des cellules provenant d'un seul patient qui pourraient ne pas présenter ce phénomène. Par ailleurs, il n'est pas exclu que le développement de cette sensibilisation aux agonistes de RCPG couplés à Gq nécessite, pour se développer de manière robuste, la présence d'autres partenaires cellulaires qui ne sont pas présents dans les cultures de CML.

Enfin, en parallèle de ces expériences, nous avons tenter de valider une technique de transfection transitoire qui permettrait de surexprimer GASP-1 ou des sh-RNA permettant de bloquer son expression endogène. La technique que nous avons abordée, qui regroupe une combinaison d'électroporation et de transfection chimique, s'est avérée très efficace pour la transfection des CML avec un plasmide contrôle exprimant la GFP, mais presque complètement inefficace pour la transfection d'une construction permettant l'expression de GASP-1 fusionné à la YFP. Ce résultat est vraisemblablement lié au fait qu'à la fois le plasmide d'expression que nous avons utilisé et la protéine GASP-1 fusionné à la YFP présentent des tailles nettement supérieures au vecteur permettant l'expression de la GFP fourni par le fabricant du kit de transfection. Une alternative pourrait-être d'utiliser un vecteur viral. Ce type de vecteur s'est avéré très efficace dans de nombreuses situations. Par exemple, Yang et collaborateurs (Yang *et al.*, 2011) ont utilisé un vecteur lentiviral pour exprimer de manière efficace la protéine RGS5 dans les CML.

IV.C. Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre au point un modèle chez la souris permettant de visualiser les conséquences négatives à long terme d'un traitement chronique avec un agoniste bêta2-adrénergique, le formotérol, couramment utilisé en clinique. A l'aide de ce modèle, nous avons montré que la protéine GASP-1, qui interagit avec le récepteur B2-AR mais dont la fonction est encore mal connue, est essentielle pour la mise en place de ces adaptations et notamment le développement de l'hyperréactivité bronchique induite par le formotérol et de la tolérance à l'effet bronchodilatateur de ce composé. Nos tentatives pour visualiser ces phénomènes dans des systèmes moins complexes (trachée isolée, cellules de muscle lisse bronchique en culture) se sont malheureusement révélées infructueuses. Néanmoins, ce travail nous a conduit à développer un second projet (réalisé par un autre étudiant en thèse du laboratoire) qui nous a permis d'identifier des petites molécules capables de bloquer l'interaction entre le récepteur B2-AR et GASP-1. Ces molécules sont en cours de validation et pourront être testées dans notre modèle d'hyperréactivité bronchique induite par le formotérol. A terme, l'utilisation de tels composés en association avec les agonistes bêta2-adrénergiques pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de l'asthme en limitant le développement des effets secondaires indésirables associées aux traitements chroniques avec les LABA. Les résultats présentés dans ce manuscrit, associés aux résultats obtenus avec les petites molécules en développement, feront l'objet d'un dépôt de brevet en association avec la Société d'Aide au Transfert de Technologies (SATT) de Strasbourg.

V. Références bibliographiques

Abu-Helo, A. and Simonin, F. (2010). Identification and biological significance of G protein-coupled receptor Associated Sorting Proteins (GASP). *Pharmacology & Therapeutics*, **126**: 244-250.

Baneres, J.L., and Parello, J. (2003). Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol*, **329**: 815-829.

Bartlett, S. E., Enquist, J., Hopf, F.W., Lee, J.H., Gladher, F., Kharazia, V., Waldhoer, M., Mailliard, W.S., Armstrong, R., Bonci, A., Whistler, J.L. (2005). Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 11521-11526.

Benovic, J. L., Mayor, F., Jr., Somers, R. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1986). Lightdependent phosphorylation of rhodopsin by beta-adrenergic receptor kinase. *Nature*, **321** : 869-872.

Bockaert, J. (1996). Récepteurs couplés aux protéines G: des concepts à la structure. *Medecine/Science*, **12**: 79-85.

Bockaert, J., and Pin, J.P. (1998). [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C R Acad Sci III*, **321**: 529-551.

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

Bœuf, J., Trigo J. M., Moreau P.-H., Lecourtier L., Vogel E., Cassel J.-C., Mathis C., Klosen P., Maldonado, R., Simonin, F. (2009). Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1 deficient mice. *European. J. Neurosci*, **30**: 860-868.

Bornert, O., Møller, T. C., Boeuf, J., Candusso, M. P., Wagner, R., Martinez, K. L and Simonin, F. (2013) Identification of a Novel Protein-Protein Interaction Motif Mediating Interaction of GPCR-Associated Sorting Proteins with G Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE*, **8**: e56336.

Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, **333**: 370-373.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, **2**: 274-286.

Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A.,

Mazzoni, M.R., and Hamm, H.E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev*,**24**: 765-781.

Cao, T. T., Deacon, H. W., 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.

Caron, M. G., Srinivasan, Y., Pitha, J., Kociolek, K. & Lefkowitz, R. J. (1979). Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*,**254**: 2923-2927.

Carlton, J.G., Agromayor, M. & Martin-Serrano, J.(2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 10541-10556.

Carlson, L.A. & Hurley, J.H. (2012). In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**16**:16928-16933.

Cates, C. J and Cates, M.J. (2012) Regular treatment with formoterol for chronic asthma: serious adverse events. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4: 1-108.

Ceresa, B. P. & Limbird, L. E. (1994). Mutation of an aspartate residue highly conserved among G-protein-coupled receptors results in nonreciprocal disruption of alpha 2-adrenergic receptor-G-protein interactions. A negative charge at amino acid residue 79 forecasts alpha 2A-adrenergic receptor sensitivity to allosteric modulation by monovalent cations and fully effective receptor/G-protein coupling. *J Biol Chem*,**269**: 29557-29564.

Chen, C.A., and Manning, D.R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*,**20**: 1643-1652.

Chung, S., Funakoshi, T. & Civelli, O. (2008). Orphan GPCR research, *Br J Pharmacol*. **153**:339-346.

Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1993). New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature*,**365**: 403-406.

Clark, A.J. (1933). *The Mode of Action of Drugs on Cells*. Edward Arnold & Co., London.

Cottrell, G. S., Padilla, B., Pikios, S., Roosterman, D., Steinhoff, M., Gehringer, D., Grady, E.F., Bunnerr, N.W. (2006). "Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor." *J Biol Chem*,**281**: 27773-27783.

Craft, C. M., Whitmore, D. H., and Wiechmann, A. F. (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem*,**269**: 4613-4619

Daubeuf, F., Reber, L., and Frossard, N.(2013)a. Measurement of Airway

Responsiveness on Vigil and Unrestrained Mouse. <http://www.bioprotocol.org/wenzhang.aspx?id=328>.

Daubeuf, F., Reber, L., and Frossard, N.(2013)b. Measurement of Airway Responsiveness in the Anesthetized Mouse. <http://www.bioprotocol.org/wenzhang.aspx?id=645>.

Deepak, A., Deshpande, Raymond B. Penn. (2006). Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma. *Cellular Signalling*,**18**: 2105–2120

Delayre-Orthez, C., de Blay, F., Frossard, N. and Pons, F. (2004). Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy*, **34**:1789-1795.

De Lean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*,**255**: 7108-7117.

Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Strader, C. D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*,**321**: 75-79.

Dohlman, H.G., and Thorner, J. (1997). RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem*,**272**: 3871-3874

Dores, M.R., Chen, B., Lin, H., Soh, U.J., Paing, M.M., Montagne, W.A., Meerloo, T., and Trejo, J. (2012). ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol*,**30**:407-419.

Dores, M.R., and Trejo, J.(2014). Atypical regulation of G protein-coupled receptor intracellular trafficking by ubiquitination. *Curr Opin Cell Biol*,**27**:44-50.

Ehrlich, P. (1956). The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography. *Histology, Biochemistry and Pathology*,**1**: 65-98.

Ehrlich, P. (1957)a. The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography. *Immunology and Cancer Research*,**2**: 107-125.

Ehrlich, P.(1957)b. The collected Papers of Paul Ehrlich in four volumes including a complete bibliography. *Immunology and Cancer Research*,**2**: 205-212.

Faisy, C., Naline, E., Diehl, J. k., Emonds. Alt, X., Chinet, T., and Advenier, C. (2002). In vitro sensitization of human bronchus by β 2 adrenergic agoniste. *Am J physiol Cell Mol Physiol*,**283**: 1033-1042.

- Flanagan, C. A. (2005). A GPCR that is not "DRY". *Mol Pharmacol*, **68**: 1-3.
- Finney, P.A., Belvisi, M.G., Donnelly, L.E., Chuang, T.T., Mak, J.C.W., and Scorer, C. (2000). Albuterol-induced downregulation of Gs_i accounts for pulmonary Beta(2)-adrenoceptor desensitization in vivo. *J Clin Invest*, **106**:125-135
- Freund-Michel, V., Pons, F., Joly, V., Mathieu, E., Martinet, N., and Frossard, N. (2002). Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J*, **20**: 458-463.
- Exton, J. H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **36**: 481-509.
- Freund-Michel, V., Bertrand, C., and Frossard, N. (2006). TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal*, **18**: 621-627.
- Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**: 778-786.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., and Schultz, G. (1996). Diversity and selectivity of receptor- protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **36**: 429-459
- Hachet-Haas, M., Converset, N., Marchal, O., Matthes, H., Gioria, S., Galzi, J.L., Lecat, S. (2006). FRET and colocalization analyzer--a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in. *Microsc Res Tech*, **69**: 941-956.
- Hanoune, J., and Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**: 145-174
- Hanyaloglu, A. C., McCullagh, E., Von Zastrow, M. (2005). Essential role of Hrs in a recycling mechanism mediating functional resensitization of cell signaling. *Embo J*, **24**: 2265-2283.
- He, C., Wei, Y., Sun, K., Li, B., Dong, X., Zou, Z., Liu, Y., Kinch, L.N., Khan, S., Sinha, S., Xavier, R.J., Grishin, N.V., Xiao, G., Eskelinen, E.L., Scherer, P.E., Whistler, J.L., and Levine, B. (2013). Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell*, **154**: 1085-1099.
- Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J., and Bunemann, M. (2005). Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *Embo J*, **24**: 4106-4114.
- Henderson, R. & Unwin, P. N. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, **257**: 28-32.

Henry, A.G., White, I.J., Marsh, M., von Zastrow, M., Hislop, J.N.(2011). The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of delta-opioid receptors. *Traffic*, **12** : 170-184.

Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **99**: 25-44.

Herrmann, R., Heck, M., Henklein, P., Kleuss, C., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2004). Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem*,**279**: 24283-24290.

Heydorn, A., Sondergaard, B. P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F.C., Haft, C.R., Whistler, J., Schwartz, T.W. (2004). A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem*,**279**: 54291-54303.

Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E. & Vriend, G. (2003). GPCRDB information system for G protein-coupled receptors, *Nucleic Acids Res.* **31**, 294-7.

Itoh, Y., Cai, K., and Khorana, H.G. (2001). Mapping of contact sites in complex formation between light-activated rhodopsin and transducin by covalent crosslinking: use of a chemically preactivated reagent. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**98**: 4883-4887.

Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P. & Stevens, R. C. (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*,**322**: 1211-1217.

Jacob, C., Cottrell, G. S., Gehringer, D., Schmidlin, F., Grady, E.F., Bunnett, N.W. (2005). "c-Cbl mediates ubiquitination, degradation, and down-regulation of human protease-activated receptor 2." *J Biol Chem*,**280**: 16076-16087.

January, B., Seibold, A, Whaley, B., Hipkin, R.W., Lin, D., Schonbrunn, A., Barber, R., Clark, R.B. (1997). beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem*, **272**: 23871-23879.

Janz, J.M., and Farrens, D.L. (2004). Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J Biol Chem*,**279**: 29767-29773.

Josefsson, L. G. (1999). Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene*,**239**: 333-340.

Katzmann, D. J., Babst, M., Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex. ESCRT-I. *Cell*,**106**: 145-155.

Kenakin, T. (2004). Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol*

Sci,**25**: 186-192.

Kolakowski, L. F., Jr. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*,**2**: 1-7.

Krasel, C., Bunemann, M., Lorenz, K. & Lohse, M. J. (2005). Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *J Biol Chem*, **280**: 9528-9535.

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.

Krupnick, J. G. & Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,**38**: 289-319.

Kumari, T., Pant, B. & Pardasani, K. R. (2009). A model for the evaluation of domain based classification of GPCR. *Bioinformation*,**4**: 138-142.

Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature*,**379**: 311-319.

Langley, J. N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare. *J. Physiol*,**33**: 374–413

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

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*,**248**: 1547-1550.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*,**248**: 1547-1550.

Lohse, M. J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J. P., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry*,**267**: 8558-8564.

Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K. & Lefkowitz, R. J. (1997). Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*,**272**: 4637-4644.

- Magalhaes, A.C., Dunn, H., Ferguson, S.S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol*, **165**: 1717-1736.
- Malbon, C. C. (2004). Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci*, **9**: 1048-1058.
- Marchese, A. and Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem*, **276**: 45509-45512.
- Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J.H., Stenmark, H., Benovic, J.L. (2003). "The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4." *Dev Cell*, **5**: 709-722.
- Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 368-376.
- Martin, N. P., Lefkowitz, R. J., Shenoy, S.K. (2003). Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem*, **278**: 45954-45959.
- Martini, L., Waldhoer, M., Pusch, M., Kharazia, V., Fong, J., Lee, J.H., Freissmth, C., Whistler, J.L. (2007). Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *Faseb J*, **21**: 802-811.
- Matsuki, T., Kiyama, A., Kawabuchi, M., Okada, M., Nagai, K. (2001). A novel protein interacts with a clock-related protein, rPer1. *Brain Res*, **19**: 1-10.
- Michel, G., Matthes, H.W., Hachet-Haas, M., El Baghdadi, K., de Mey, J., Pepperkok, R., Simpson, J.C., Galzi, J.L., and Lecat, S. (2014). Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. *J Cell Sci* **127**: 773-787.
- Miller, L. J., Dong, M., Harikumar, K. G. & Gao, F. (2007). Structural basis of natural ligand binding and activation of the Class II G-protein-coupled secretin receptor. *Biochem Soc Trans*, **35**: 709-712.
- Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*, **147**: 46-55.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J*, **26** : 4215-4227.
- Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. (2005). Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, **307**: 1638-1642.
- Nakata, H., Kameyama, K., Haga, K. & Haga, T. (1994). Location of agonist-dependent phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine

receptors (m2 subtype). *Eur J Biochem*, **220**: 29-36.

Naline, E., Zhang, Y., Qian, Y., Mairon, N., Anderson, G.P., Grandordy, B., and Advenier, C. (1994). Relaxant effects and durations of action of formoterol and salmeterol on the isolated human bronchus. *Eur Respir J*, **7**: 914-920.

Nathans, J. & Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, **34**: 807-814.

Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, **80**: 249-257.

Neubig, R.R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J*, **8**: 939-946.

Nino, G., Hu, A., Grunstein, JS., Grunstein, MM. (2009). Mechanism regulating proasthmatic effects of prolonged homologous beta2-adrenergic receptor desensitization in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*, **297**: 746-757.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**: 60-71.

Onaran, H.O., and Costa, T. (1997). Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann N Y Acad Sci*, **812**: 98-115.

Onrust, R., Herzmark, P., Chi, P., Garcia, P.D., Lichtarge, O., Kingsley, C., and Bourne, H.R. (1997). Receptor and betagamma binding sites in the alpha subunit of the retinal G protein transducin. *Science*, **275**: 381-384.

Pilot-Storck, F. (2011-2012). *Physiologie des grandes fonctions, introduction générale*. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. Unité de Physiologie-pharmacologie.

Pantages, E. & Dulac, C. (2000). A novel family of candidate pheromone receptors in mammals. *Neuron*, **28**: 835-845.

Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1992). Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry*, **31**: 3193-3197.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**: 739-745.

Pantages, E. & Dulac, C. (2000). A novel family of candidate pheromone receptors in mammals. *Neuron*, **28**: 835-845.

Pin, J. P., Galvez, T. & Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation

mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **98**: 325-354.

Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D.I., Göttinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*, **17**: 843-856.

Prabhu, Y. & Eichinger, L. (2006). The Dictyostelium repertoire of seven transmembrane domain receptors. *Eur J Cell Biol*, **85**: 937-946.

Rafferty, C. N., Cassim, J. Y. & McConnell, D. G. (1977). Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin in situ and solubilized with detergent. *Biophys Struct Mech*, **2**: 227-320.

Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **450**: 383-387.

Reiter, M.J. (2004). Cardiovascular drug class specificity: β -Blockers. *Prog Cardiovasc Dis*, **47**:11-33.

Riviere, J.E., Papich, M.G. (2009). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. *Wiley Blackwell*, **9**: 126-152.

Rovati, G. E., Capra, V. & Neubig, R. R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, **71**: 959-964.

Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., and Lefkowitz, R.J. (1993). A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, **268**: 4625-4636.

Schioth, H. B. & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*, **142**: 94-101.

Sears, M.R. and Taylor, D.R. (1994). The β 2-Agonist controversy. Observation, explanations and relationship to asthma epidemiology. *Drug Saf*, **11**: 259-283.

Sette, P., Jadwin, J.A., Dussupt, V., Bello, N.F., and Bouamr, F. (2010). The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL L domain motif. *J Virol*, **84** : 8181-8192.

Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J. (2001). "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin." *Science*, **294**:1307-1313.

Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2004). Resonating to the music of ubiquitination. *Nat*

Methods, **1**:191-193.

Shi, X., Betzi, S., Lugari, A., Opi, S., Restouin, A., Parrot, I., Martinez, J., Zimmermann, P., Lecine, P., Huang, M., Arold, S.T., Collette, Y., and Morelli, X. (2012). Structural recognition mechanisms between human Src homology domain 3 (SH3) and ALG-2-interacting protein X (Alix). *FEBS Lett*, **586**: 1759-1764.

Simonin, F., Karcher, P., Bœuf, J., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2004). Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem*, **89**: 768-775.

Smith, W. C., Milam, A. H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P. A., and Palczewski, K. (1994) A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *The Journal of biological chemistry*, **269**: 15407-15410.

Sprang, S.R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*, **66**: 639-678.

Tamaoki, J., Tagaya, E., Kawatani, K., Nakata, J., Endo, Y., Nagai, A. (2004). Airway mucosal thickening and bronchial hyperresponsiveness induced by inhaled beta 2-agonist in mice. *Chest*, **126**:205-212

Tanowitz, M., and Von Zastrow, M.(2002). Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem*, **277**: 50219-50222.

Tanowitz, M., and 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.

Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubin, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie, K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., Kuner, T., Kuner, R. (2007). A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *J Neurosci*, **27**: 4165-4177.

Tesmer, J.J., Sunahara, R.K., Gilman, A.G., and Sprang, S.R. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*, **278**: 1907-1916.

Thompson, D., Pusch, M., Whistler, J.L. (2007). Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, **282**: 29178-29185.

Volovyk, Z. M., Wolf, M. J., Prasad, S. V. & Rockman, H. A. (2006). Agonist-stimulated betaadrenergic receptor internalization requires dynamic cytoskeletal actin turnover. *J Biol Chem*, **281**: 9773-9780.

Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G.,

and Sprang, S.R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*,**83**: 1047-1058.

Wang, H. Y., Liu, T. & Malbon, C. C. (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal*,**18**: 934-941.

Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G. & Schertler, G. F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, **454**: 486-491.

Weiss, J.M., Morgan, P.H., Lutz, M.W., and Kenakin, T.P. (1996). The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol*,**181**: 381-397.

Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S.R., VonZastrow, M. (2002). Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*,**297**:615-620.

Wijesinghe, M., Weatherall M., Perrin K., Harwood M., Beasley R. (2009). Risk of mortality associated with formoterol : a systematic review and meta-analysis . *Eur. Respir J*,**34**: 803-811.

Wolfe, B. L. & Trejo, J. (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic*,**8**: 462-470.

Yang, Z., Cooper, P.R., Demera, G., Mukhopadhyay, I., Cho, H., Kehrl, J.H., Panettieri RA, Jr., Druey, K.M. (2011). Beta-agonist-associated reduction in RG55 expression promotes airway smooth muscle hyper-responsiveness. *J. Biol Chem*,**286**: 11444-11455.

Zhai, Q., Fisher, R.D., Chung, H.Y., Myszka, D.G., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2008). Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol*, **15**:43-49.

Zhang, M., Turnbaugh, D., Cofie, D., Dogan, S., Koshida, H., Fugate, R., and Kem, D.C. (1996). Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension*,**27**: 269-275.

**Implication de GASP-1 dans la
modulation de l'activité des agonistes
du récepteur bêta-2 adrénergique dans
la fonction respiratoire**

Résumé

GASP1 modulerait le trafic intracellulaire des RCPG après endocytose provoquée par les ligands. Au cours de ce travail nous nous sommes focalisés sur l'interaction de GASP-1 avec le récepteur beta2-adrénergique (B2AR) et ses conséquences fonctionnelles. Les agonistes du récepteur B2AR sont des bronchodilatateurs puissants utilisés dans le traitement de l'asthme. Avec le Dr N. Frossard, nous avons montré qu'un traitement chronique avec un agoniste B2AR induit le développement d'une hyper-réactivité bronchique chez les souris sauvages mais pas chez les KO GASP1. Ce phénotype n'est pas relié à une différence dans la dégradation du récepteur B2AR entre les souris sauvages et KO GASP-1 mais est corrélé avec une augmentation du niveau de collagène dans les poumons des souris sauvages. Nos résultats indiquent que GASP1 joue un rôle important dans ce phénomène adaptatif qui serait relié à un remaniement des tissus bronchiques dépendant de cette protéine.

Mots-clés: GPCR; GASP1; Récepteur bêta-2 adrénergique; Asthme

Résumé en anglais

GASP1 have been shown to modulate the postendocytic sorting of different GPCRs. In order to better understand the role of GASP1 in regulating the activity and intracellular trafficking of GPCRs, we have focused our project on the functional consequences of the interaction between GASP1 and beta2-adrenergic receptor (B2AR). B2AR agonists are potent bronchodilators used in the treatment of asthma. With Dr. N. Frossard, we have shown that a chronic treatment with a B2AR agonist induces the development of bronchial hyperresponsiveness in wild-type but not in KO GASP1 mice. Furthermore, we have shown that this phenotype is not related to a difference of B2AR receptor degradation between wild-type and KO animals but correlates with an increase in collagen levels in the lungs of wild-type mice that is not observed in GASP1KO animals. Altogether, our data suggest that GASP1 is critically involved in these adaptations, which could be related to a GASP1-dependent modification of lung tissues.

Keywords: GPCR; GASP1; Beta2-adrenergic receptor; Asthma