

Le récepteur β_2 -adrénergique Un modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la désensibilisation

La stimulation prolongée d'un récepteur membranaire par son ligand induit souvent un état de désensibilisation interrompant la transmission du signal. Ainsi, le récepteur β_2 adrénergique couplé à la protéine Gs et à l'adénylyl cyclase est-il tout d'abord phosphorylé par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et, à forte concentration en ligand, par la β ARK (*β adrenergic receptor kinase*) qui est recrutée par l'activation du récepteur et la dissociation des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine Gs. La phosphorylation du récepteur par la β ARK, sur des sites différents des cibles de la PKA, permet la fixation d'une protéine inhibitrice dénommée arrestine qui bloque l'interaction entre le récepteur et la protéine Gs. À plus long terme, l'internalisation du récepteur dans les endosomes, sa possible dégradation dans les lysosomes et la modification de l'abondance du messenger peuvent contribuer à la régulation de la sensibilité au ligand. L'importance de ces phénomènes est bien mise en évidence par la comparaison entre les récepteurs β_2 et β_3 adrénergiques ; ces derniers ne sont phosphorylés, ni par la PKA, ni par la β ARK, et ne sont pas désensibilisés lors d'une stimulation prolongée.

Michel Bouvier
François Nantel
Manon Valiquette
Serge Moffett
Bernard Mouillac

ADRESSE

M. Bouvier : professeur agrégé. F. Nantel : étudiant en thèse de biochimie. M. Valiquette : étudiante en thèse de biochimie. S. Moffett : étudiant en thèse de biochimie. B. Mouillac : stagiaire post-doctoral. Département de biochimie, faculté de médecine, université de Montréal, Case Postale 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Québec H3c 3J7, Canada.

Les fonctions premières des récepteurs sont de reconnaître spécifiquement un *stimulus* parmi la multitude de ceux présentés simultanément à une cellule (fonction de discrimination) et de permettre la propagation intracellulaire de l'information véhiculée par le transmetteur (fonction de transduction). Le transfert d'information est rendu possible par la stimulation d'un système effecteur qui conduit à la production d'un second messenger intracellulaire.

Ce faisant, les récepteurs ne font pas que transmettre les signaux extracellulaires mais contribuent aussi à leur amplification. De plus, une régulation dynamique des systèmes de réception contrôle étroitement leur réactivité. Ces processus de régulation permettent à la cellule de s'adapter à son environnement et contribuent à l'intégration des signaux menant à une réponse cellulaire adéquate.

Un des phénomènes régulateurs qui jouent un rôle important dans la ges-

RÉFÉRENCES

1. Brodde OE. β_1 - and β_2 -adrenoceptor in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 1992; 43: 203-42.
2. Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *médecine/sciences* 1995; 11: 382-94.
3. Parmentier M, Vanderhaegen P, Schurmans S, Libert F, Vassart G. Génétique moléculaire des récepteurs olfactifs. *médecine/sciences* 1994; 10: 1083-90.
4. Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science* 1993; 2: 1198-209.
5. Henderson R, Unwin PNT. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 1975; 257: 28-32.
6. Hibert MF, Hoflack J, Trumppkallmeyer S, Bruinvels A. Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G. *médecine/sciences* 1993; 9: 31-40.
7. Schertler GFX, Villa C, Henderson R. Projection structure of rhodopsin. *Nature* 1993; 362: 770-2.
8. Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 1988; 263: 4993-6.
9. Yatani A, Imoto Y, Codina J, Hamilton SL, Brown AM, Birnbaumer L. The stimulatory G protein of adenyl cyclase, G_s , also stimulate dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 1988; 263: 9887-95.
10. Voyno-Yasenetskaya T, Conklin BR, Gilbert RL, Hooley R, Bourne HR, Barber DL. G_{i3} stimulates Na-H exchange. *J Biol Chem* 1994; 269: 4721-4.
11. Yoshimasa T, Bouvier M, Benovic JL, Amlaiki N, Lefkowitz RJ, Caron MG. In: McKerns KW, Chretien M, eds. *Molecular biology of brain and endocrine peptidergic systems*. New York: Plenum Publishing Co, 1988: 123-39.
12. Milligan G. Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanism and functional implications. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 413-8.
13. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1980; 255: 7108-17.
14. Benovic JL, Bouvier M, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of adenyl cyclase-coupled β -adrenergic receptors. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 405-28.

tion des signaux extracellulaires est connu sous le nom de désensibilisation. D'une manière générale, la désensibilisation se définit par une diminution de l'intensité de la réponse cellulaire malgré la présence continue d'un stimulus d'égale intensité. Les termes tolérance, habituation ou tachyphylaxie sont aussi utilisés pour décrire ce phénomène. La désensibilisation a pour effet de prévenir la surcharge du système de signalisation et de circonscrire dans le temps les effets d'une stimulation. Dans le contexte d'interventions thérapeutiques, la désensibilisation est perçue comme un phénomène indésirable puisqu'elle peut compromettre l'efficacité et limiter la durée d'action de certains médicaments. Notamment, les effets bénéfiques des agonistes β -adrénergiques dans le traitement de la défaillance cardiaque chronique sont compromis par la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques [1]. Au cours des dix dernières années, on a non seulement décrit les manifestations cellulaires des phénomènes de désensibilisation, mais on a aussi entrevu leurs mécanismes moléculaires. Ceux-ci ont été particulièrement bien étudiés pour les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Les RCPG partagent un mécanisme biochimique commun de transduction du signal impliquant une interaction entre trois protéines membranaires: un récepteur transmembranaire; une protéine hétérotrimérique liant les nucléotides guanylés et connue sous le nom de protéine G; une enzyme, un canal ionique ou un transporteur dont l'activité peut être modulée par une protéine G (figure 1). De tels systèmes sont responsables de la propagation cellulaire de signaux aussi divers que la lumière, les odeurs, les hormones, les neurotransmetteurs et les phéromones dans des organismes allant de la levure à l'homme [2]. La structure moléculaire de plus d'une centaine de ces récepteurs a été révélée par le clonage et le séquençage de leur ADNc et/ou de leur gène. L'analyse de la séquence primaire de ces récepteurs permet de prédire un motif d'organisation membranaire se composant de sept segments hydro-

phobes pouvant former des hélices α transmembranaires [2, 3] reliées entre elles par trois boucles extracellulaires et trois boucles cytoplasmiques, une extrémité aminoterminal extracellulaire et une queue carboxyterminale cytoplasmique. Cette organisation structurale parfaitement conservée constitue le trait dominant de cette superfamille de récepteurs [4]. Ce modèle structural s'appuie sur le fait que l'analyse d'hydrophobicité procure des profils remarquablement semblables à celui obtenu pour la bactériorhodopsine pour laquelle cette organisation a été confirmée par diffraction des électrons sur des cristaux bidimensionnels [5, 6]. Plus récemment, cette structure a aussi été confirmée expérimentalement pour la rhodopsine d'origine bovine [7]. Une telle similitude structurale entre les RCPG a conduit plusieurs auteurs à suggérer que ces récepteurs pourraient partager des mécanismes communs d'activation, de transduction et de régulation. Ainsi, l'élucidation, pour certains récepteurs, des mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus a permis l'élaboration d'un modèle général servant de cadre d'étude à l'ensemble de cette famille de récepteurs. Un des récepteurs dont la régulation a été la plus étudiée est sans doute le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) qui peut être considéré à plusieurs titres comme le prototype des RCPG [8].

Le β_2 AR est présent dans presque tous les tissus de mammifères et est responsable de la régulation de processus aussi variés que le métabolisme, la contractilité des muscles lisses et cardiaques et la sécrétion de plusieurs hormones. L'activation du β_2 AR stimule l'adényl cyclase via son interaction avec une protéine G stimulatrice de type G_s . La majorité des effets biologiques résultant de l'activation de ce récepteur peuvent être expliqués par sa capacité de promouvoir la formation d'AMPc. En revanche, il a récemment été suggéré que G_s pourrait aussi, par une interaction directe, stimuler un canal calcique [9] et un échangeur Na/H [10] en réponse à une stimulation β -adrénergique. Peu de choses sont cependant connues concernant les processus d'activation et de désensibilisation de ces voies de signalisation

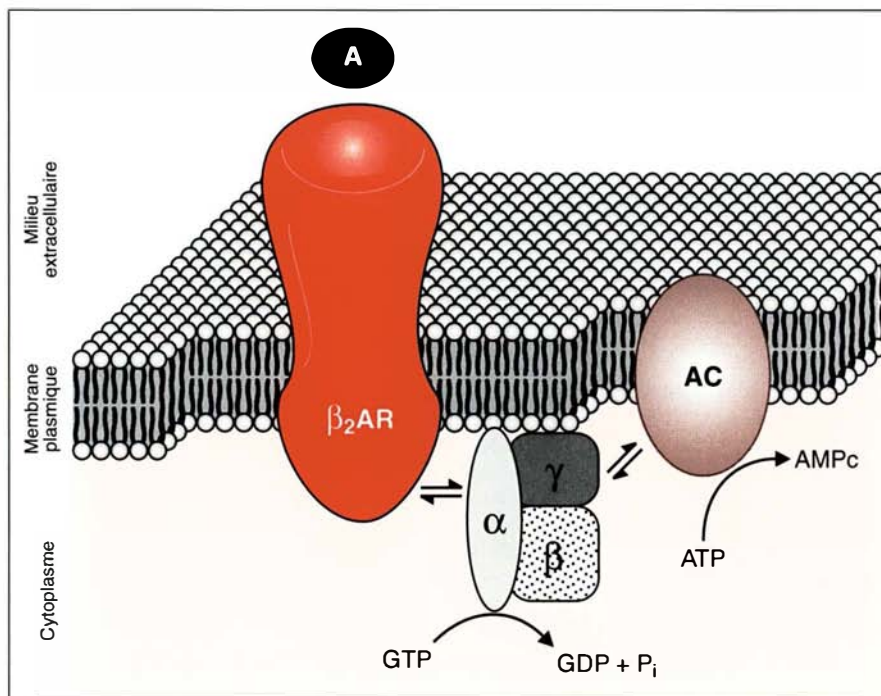


Figure 1. **Représentation schématique de l'unité de transduction minimale des RCPG.** Dans l'exemple choisi, la stimulation du récepteur β₂-adrénergique (β₂AR) par son ligand naturel, l'adrénaline (A), favorise la stimulation de l'adénylyl cyclase (AC) via son interaction avec une protéine G de type stimulatrice (Gs) (sous-unités α, β, γ).

et la plupart des études de la régulation du β₂AR ont porté sur le système β₂AR/Gs/adénylyl cyclase.

Désensibilisation du β₂AR

La désensibilisation peut être étudiée d'un point de vue phénoménologique dans plusieurs modèles animaux mais ces systèmes se prêtent mal à l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires. C'est donc l'utilisation de lignées cellulaires en culture exprimant de façon endogène le β₂AR qui a d'abord rendu possible l'identification des divers processus impliqués dans ce phénomène régulateur. Plus récemment, le clonage moléculaire du récepteur et l'utilisation de systèmes d'expression hétérologue couplée à la mutagenèse dirigée ont permis d'élucider plusieurs de ces processus à l'échelle moléculaire.

La désensibilisation du β₂AR se manifeste au niveau cellulaire par une diminution de la capacité des agonistes β-adrénergiques de stimuler la production d'AMPc. La figure 2 illustre la désensibilisation du β₂AR humain telle qu'elle est observée dans un système d'expression hétérologue. On constate que le pré-traitement des cellules par un agoniste β-adrénergique, l'isoprotérénol, produit une diminution graduelle de la capacité du β₂AR de stimuler la production d'AMPc. Bien que des processus agissant au niveau de l'adénylyl cyclase [11] et de la protéine Gs [12] puissent contribuer à la désensibilisation, la régulation au niveau du récepteur lui-même joue un rôle prépondérant. En effet, en tant que site initial d'interaction avec les transmetteurs, le récepteur occupe une position privilégiée pour régler de manière efficace la sensibilité cellulaire.

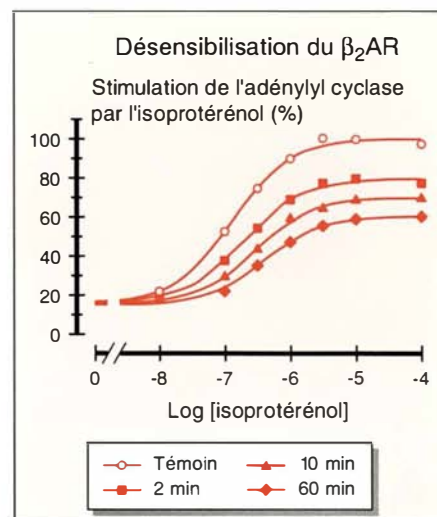


Figure 2. **Illustration du phénomène de désensibilisation du β₂AR tel qu'il est observé dans des fibroblastes exprimant un ADNc codant pour le β₂AR humain.** Ces cellules ont été exposées ou non (témoin) à une concentration de 1 μM d'isoprotérénol pendant des périodes allant de 2 à 60 minutes. A la suite de ce traitement, l'activité de l'adénylyl cyclase stimulée par des concentrations croissantes d'isoprotérénol a été mesurée sur des préparations membranaires. On constate que le pré-traitement entraîne une diminution de la stimulation de l'adénylyl cyclase par l'agoniste β₂-adrénergique.

Au moins deux processus agissant au niveau du récepteur contribuent au phénomène de désensibilisation du β₂AR. Il s'agit du découplage fonctionnel et de la régulation négative du récepteur (figure 3). Le découplage fonctionnel du β₂AR se caractérise par une diminution de la capacité du récepteur d'interagir avec la protéine Gs et donc de stimuler l'adénylyl cyclase sans changement du nombre de récepteurs présents à la surface de la cellule. Au contraire, la régulation négative se définit par une diminution du nombre de β₂AR. Ces deux processus, d'égale importance, se distinguent toutefois par des cinétiques très différentes. Le découplage est un phénomène très rapide, apparent dès les premières minutes de la stimulation alors que la régulation négative ne s'installe qu'après plusieurs minutes, voire plusieurs heures, de stimulation. Il est généralement

RÉFÉRENCES

15. Bouvier M, Leeb-Lundberg LMF, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of α_1 - and β_2 -adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1987; 262: 3106-13.

16. Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2797-801.

17. Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Role of $\beta\gamma$ subunits of G proteins in targeting the β -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 1992; 257: 1264-7.

18. Chen CY, Dion SB, Kim CM, Benovic JL. β -adrenergic receptor kinase. Agonist-dependent receptor binding promotes kinase activation. *J Biol Chem* 1993; 268: 7825-31.

19. Benovic JL, Gomez J. Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. *J Biol Chem* 1993; 268: 19521-7.

20. Kunapuli P, Benovic JL. Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5588-92.

21. Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. Removal of phosphorylation sites from the β_2 -adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 1988; 333: 370-3.

22. Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 1989; 264: 12657-65.

23. Onorato J, Palczewski K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Benovic JL. Role of acidic amino acids in peptide substrates of the β -adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase. *Biochemistry* 1991; 30: 5118-25.

24. Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Desensitization of the isolated β_2 -adrenergic receptor by β -adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* 1992; 31: 3193-7.

25. Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 1990; 265: 3202-9.

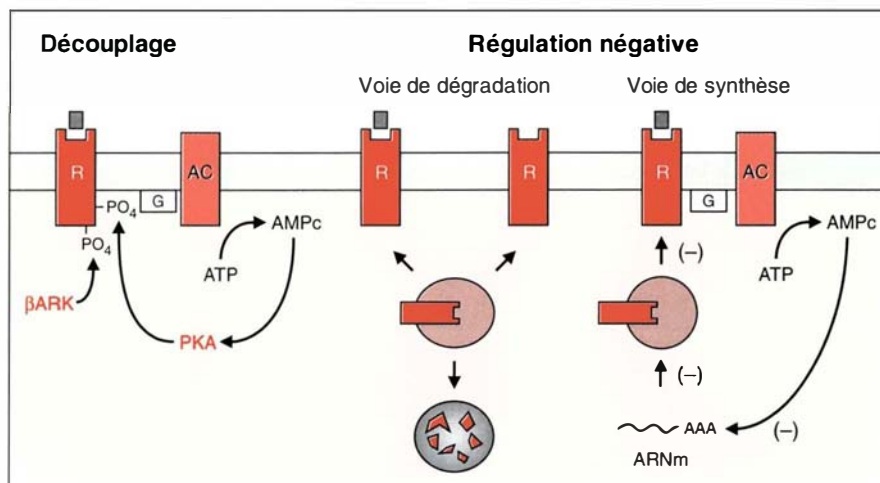


Figure 3. **Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le découplage fonctionnel et la régulation négative du β_2 AR.** Le découplage fonctionnel rapide résulte de la phosphorylation du récepteur par la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (rétrocontrôle négatif) et la kinase du β_2 AR (β ARK) qui ne peut phosphoryler le récepteur que lorsque celui-ci est activé. La régulation négative se définit par une diminution du nombre total de récepteurs, résultant d'une augmentation de la dégradation du récepteur et d'une diminution de sa synthèse consécutive à une déstabilisation de son ARNm. Il s'agit d'un processus lent, se développant sur plusieurs heures, souvent maximal après 24 heures de stimulation continue par de fortes doses d'agoniste.

admis que le découplage serait surtout impliqué dans les ajustements fins et rapides permettant un contrôle continu de l'efficacité de signalisation. La régulation négative, pour sa part, servirait de mécanisme d'urgence protégeant l'intégrité cellulaire contre une stimulation soutenue.

Découplage fonctionnel

Le découplage fonctionnel précède largement tout changement du nombre de récepteurs. De même, ce processus n'entraîne aucun changement de l'affinité du β_2 AR pour les antagonistes β -adrénergiques. En revanche, le profil de liaison du récepteur aux agonistes est affecté au cours du découplage et la proportion de récepteurs à forte affinité pour les agonistes se trouve considérablement réduite. Cet état de fait se traduit expérimentalement par un déplacement vers la droite des courbes de liaison des agonistes et par une perte de la sensibilité de cette liaison aux nucléotides guanylés. Une telle baisse relative d'affinité pour les agonistes est interprétée comme une diminution de la capacité du récepteur d'interagir

avec la protéine Gs. En effet, il est généralement accepté que la forme de forte affinité du β_2 AR (qui est sensible aux nucléotides guanylés) représente le récepteur couplé à Gs [13].

Phosphorylation

De nombreuses études ont démontré que le découplage rapide du β_2 AR s'accompagne d'une augmentation du niveau de phosphorylation du récepteur [14]. La phosphorylation par au moins deux protéines kinases distinctes, la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et la kinase du récepteur β -adrénergique (β ARK), contribue au processus de découplage (figure 3). La PKA, dont l'activation résulte de l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc induite par l'activation du β_2 AR, prend donc part à un mécanisme de rétrocontrôle négatif [15]. La β ARK, pour sa part, n'est stimulée par aucun second messager mais ne peut phosphoryler le récepteur que lorsque celui-ci est activé [16]. Cette dépendance stricte vis-à-vis de l'activation par un agoniste découle de deux propriétés intrinsèques de la β ARK. Tout d'abord,

l'association de la β ARK à la membrane plasmique, là où elle peut phosphoryler le récepteur, résulte de l'interaction de la kinase avec les sous-unités $G\beta\gamma$ qui sont libérées lors de l'activation de G_s [17]. Deuxièmement, seul le récepteur lié à un agoniste peut servir de substrat pour la β ARK [16, 18]. La nature du changement conformationnel induit par la liaison de l'agoniste et qui permet la phosphorylation du β_2 AR par la β ARK demeure, cependant, inconnue. La β ARK fait partie d'une famille multigénique de kinases connues sous le nom de kinases des RCPG (GRK) qui comprend la rhodopsine kinase, première de cette famille à avoir été identifiée. A ce jour, au moins six GRK ont été identifiées [19]. Des études récentes suggèrent que ces différentes kinases pourraient avoir une certaine sélectivité vis-à-vis des récepteurs qu'elles peuvent phosphoryler ajoutant ainsi un niveau supplémentaire de spécificité [20]. Il serait, toutefois, surprenant qu'une spécificité stricte existe et qu'à chaque récepteur corresponde une GRK.

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer les sites qui sont phosphorylés par les deux kinases et de disséquer la contribution des événements de phosphorylation au processus de découplage [21, 22]. Deux sites de phosphorylation par la PKA, l'un dans la troisième boucle cytoplasmique et l'autre dans la région juxtamembranaire de la queue cytosolique, ont été identifiés. Les sites de phosphorylation par la β ARK ont été attribués au domaine riche en sérines et en thréonines de la partie C-terminale de la queue cytosolique (*figure 4*). Il a été proposé que les sérines et les thréonines qui sont flanquées en position N-terminale ($n+2$ ou $n+3$) par des résidus acides (acide aspartique ou acide glutamique) représentent des substrats privilégiés [23]. Cependant, l'identification précise des résidus qui sont effectivement phosphorylés par la β ARK au cours de la désensibilisation rapide reste à faire. Le découplage provoqué par la β ARK résulterait de l'interaction du récepteur avec une protéine connue sous

le nom de β -arrestine [24]. Des études récentes ont en effet démontré que la phosphorylation du β_2 AR par la β ARK favorise sa liaison à la β -arrestine au détriment de son interaction avec la protéine G_s . Un mécanisme distinct semble être responsable du découplage induit par la PKA. En effet, la phosphorylation du β_2 AR par la PKA ne change en rien son affinité pour la β -arrestine et n'en favorise pas la liaison [24]. Il a été proposé que la phosphorylation, par la PKA, du site situé dans la troisième boucle cytoplasmique puisse mener au découplage du récepteur en changeant la distribution des charges de cette région considérée comme importante dans le couplage avec la protéine G_s . Outre leur rôle dans le découplage du β_2 AR par des mécanismes différents, les deux protéines kinases sont mobilisées par des niveaux différents d'activation du récepteur [22, 25]. Pour de faibles niveaux de stimulation (< 10 nM d'isoprotérénol), la presque totalité du découplage s'explique par la phosphorylation *via* la PKA et peut

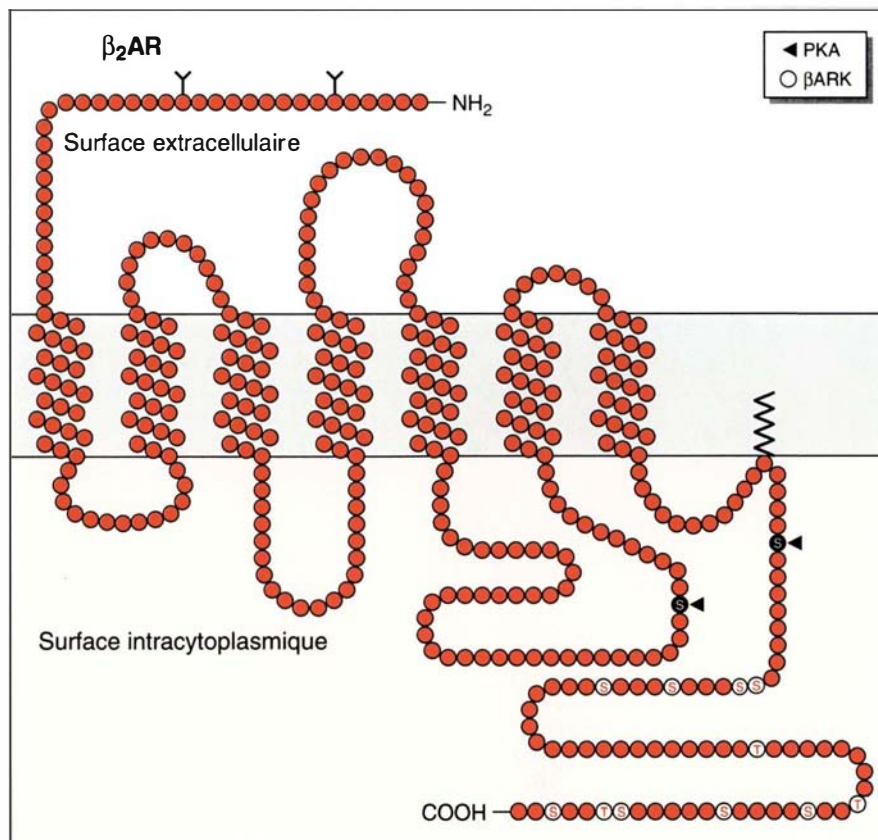


Figure 4. Structure primaire du β_2 AR humain et représentation schématique de sa topologie membranaire. Les sites de phosphorylation par la PKA et les sites potentiels de phosphorylation par la β ARK sont indiqués. Le site de palmitoylation est représenté par un serpent inséré dans la membrane. La palmitoylation est une modification post-traductionnelle qui, favorisant l'ancrage de la queue cytosolique dans la membrane plasmique, module l'accessibilité des sites de phosphorylation aux kinases.

RÉFÉRENCES

26. Ohguro H, Johnson RS, Ericsson LH, Walsh KA, Palczewski K. Control of rhodopsin multiple phosphorylation. *Biochemistry* 1994; 33: 1023-8.
27. Liggett SB, Ostrowski J, Chesnut LC, Kurose H, Raymond JR, Caron MG, Lefkowitz RJ. Sites in the third intracellular loop of the α_2 -adrenergic receptor confer short term agonist-promoted desensitization. *J Biol Chem* 1992; 267: 4740-6.
28. Hipkin RW, Sanchez-Yague J, Ascoli M. Agonist-induced phosphorylation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor expressed in a stably cell line. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 823-32.
29. Kwatra MM, Leung E, Maan AC, McMahon KK, Ptasiński J, Green RD, Hosey MM. Correlation of agonist-induced phosphorylation of chick heart muscarinic receptors with receptor desensitization. *J Biol Chem* 1987; 262: 16314-21.
30. Waldo GL, Northup JK, Perkins JP, Harden TK. Characterization of an altered membrane form of the β -adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 1983; 258: 13900-8.
31. Raposo G, Dunia I, Delavier-Klutchko C, Kaveri SV, Strosberg AD, Benedetti EL. Internalization of β -adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur J Cell Biol* 1989; 50: 340-52.
32. Wang HY, Berrios M, Malbon CC. Localization of β -adrenergic receptors in A341 cells *in situ*. Effect of chronic exposure to agonists. *Biochem J* 1989; 263: 533-8.
33. Von Zastrow M, Kobilka BK. Ligand-regulated internalization and recycling of human β_2 -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* 1992; 267: 3530-8.
34. Barak LS, Tiberi M, Feedman NJ, Kwatra MM, Lefkowitz RJ, Caron MG. A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated β_2 -adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 1994; 269: 2790-5.
35. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. β -adrenergic receptor sequestration: a potential mechanism for receptor resensitization. *J Biol Chem* 1993; 268: 337-41.
36. Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ. Phosphorylation/dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9408-12.
37. O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. Mutation of Cys³⁴¹ in the carboxyl tail leads to an uncoupled non-palmitoylated from the receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 7564-9.

être prévenue, soit en inhibant cette dernière, soit en mutant les sites de phosphorylation du β_2 AR par la PKA. A mesure de l'augmentation du niveau de stimulation, une proportion croissante du découplage résulte de la phosphorylation du β_2 AR par la β ARK. Pour des concentrations micromolaires d'isoprotérénol, près de 50 % du découplage semble résulter de l'action de la β ARK [25]. Il est à noter que le niveau absolu de découplage croît avec le niveau de stimulation, suggérant que le découplage résultant de l'action de la β ARK et de la PKA sont additifs. Une illustration graphique des deux mécanismes distincts de découplage est présentée sur la figure 5. La sensibilité à différents niveaux de stimulation s'explique aisément à partir des propriétés intrinsèques des deux kinases et de celles du système de signalisation. En effet, de faibles concentrations d'agoniste n'entraî-

nent l'occupation que d'une petite fraction des récepteurs. Puisque seuls les récepteurs occupés par un agoniste peuvent servir de substrat pour la β ARK, de tels niveaux de stimulation ne permettront la phosphorylation que d'une faible proportion de la population totale de β_2 AR par la β ARK. Le système d'amplification allant de la stimulation du récepteur à l'activation de la PKA permet, au contraire, une activation maximale de la PKA pour de faibles niveaux d'occupation du récepteur [25] favorisant ainsi une phosphorylation massive des β_2 AR par cette kinase. Aux concentrations d'agonistes permettant la liaison de tous les récepteurs, la phosphorylation par les deux kinases sera rendue possible. Suivant ce schéma, il a été proposé que le découplage résultant de l'action de la β ARK jouerait un rôle dans la régulation rapide de la réactivité des récepteurs synaptiques qui sont expo-

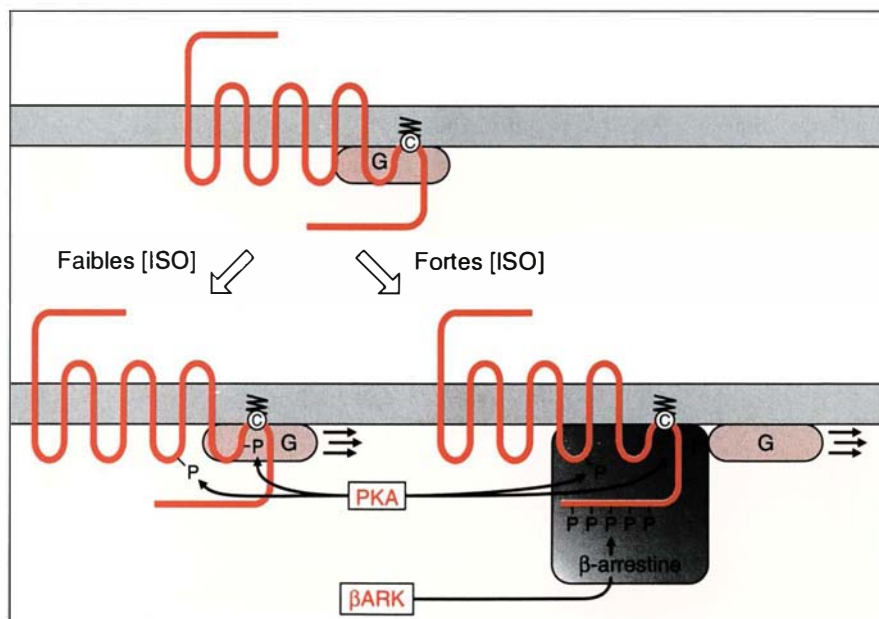


Figure 5. **Contribution de la PKA et de la β ARK aux processus de désensibilisation évoqués par des niveaux de stimulation différents.** Aux faibles niveaux de stimulation par l'isoprotérénol (ISO), seule la PKA phosphoryle le récepteur, défavorisant directement le couplage du récepteur et de la protéine Gs. Seule une faible fraction des récepteurs est occupée par l'agoniste et peut donc être phosphorylée par la β ARK. A des concentrations d'agoniste permettant l'occupation de tous les récepteurs la PKA et la β ARK phosphorylent toutes deux le récepteur et leurs effets sur le découplage sont additifs. La phosphorylation par la β ARK favorise la liaison de la β -arrestine au récepteur, diminuant d'autant les possibilités d'interaction efficace entre le récepteur et la protéine Gs.

sés à de fortes concentrations de catécholamines. La PKA contrôlerait plutôt l'état de couplage des récepteurs exprimés dans des tissus et organes périphériques dans lesquels les récepteurs sont activés par des concentrations relativement faibles de catécholamines.

L'importance de la phosphorylation dans l'instauration du découplage fonctionnel et de la désensibilisation rapide a aussi été suggérée pour d'autres RCPG. Entre autres, ce rôle a été clairement démontré pour la rhodopsine [26], le récepteur α_2A -adrénergique [27], le récepteur de l'hormone lutéinisante [28], et les récepteurs muscariniques [29].

Séquestration

Outre qu'elle entraîne un découplage fonctionnel, la stimulation soutenue du β_2AR conduit à un découplage physique du récepteur et de la protéine Gs: le récepteur est « transloqué » de la surface cellulaire vers un compartiment membranaire intracellulaire où il ne peut interagir, ni avec les agonistes hydrophiles (qui ne peuvent traverser la membrane plasmique), ni avec la protéine Gs. Tout comme le découplage fonctionnel, la séquestration est un phénomène très rapide qui peut être observé dès les premières minutes de stimulation. Une diminution du nombre de récepteurs détectés par un antagoniste hydrophile, tel le [3H]-CGP 12177 (mesurant les sites à la surface cellulaire), sans changement du nombre de sites reconnus par un antagoniste lipophile, tel le [^{125}I]-iodocyanopindolol (mesurant l'ensemble des sites), permet le diagnostic de cette forme d'internalisation du β_2AR . Ce processus est rapidement réversible et le nombre de récepteurs détectés à la surface cellulaire revient à la normale en quelques minutes lorsque la stimulation est interrompue. Bien qu'une population de vésicules légères contenant les récepteurs séquestrés puisse être séparée de la membrane plasmique par ultracentrifugation différentielle sur gradient de sucrose [30], la nature précise de ces vésicules demeure mal connue. Il a été proposé que l'internalisation des récepteurs dans des endosomes à travers une voie empruntant des vésicules couvertes de clathrine serait

responsable de la séquestration. Cette hypothèse a cependant été remise en question par certaines études qui suggèrent que le β_2AR serait plutôt internalisé *via* des vésicules dénuées de clathrine [31] ou que les récepteurs séquestrés resteraient étroitement associés à des microdomaines de la membrane plasmique [32]. Une étude récente, utilisant un β_2AR fusionné à un épitope exogène reconnu par un anticorps monoclonal de forte affinité, a permis de co-localiser le β_2AR séquestré et le récepteur de la transferrine [33]. Cette co-localisation dans des vésicules intracellulaires était l'hypothèse selon laquelle le β_2AR serait séquestré dans des endosomes.

Contrairement au découplage fonctionnel, la séquestration du β_2AR ne résulte pas de la phosphorylation du récepteur par la PKA ou la βARK . En effet, des formes mutantes du récepteur ne possédant aucun des sites de phosphorylation pour ces kinases peuvent être efficacement séquestrées au cours d'une stimulation soutenue [21, 22]. En outre, l'inhibition de ces kinases ne prévient pas la séquestration [25]. Les signaux menant à la séquestration du récepteur par suite de son activation demeurent inconnus. Une étude récente suggère cependant qu'une tyrosine localisée sur la face cytoplasmique du septième passage transmembranaire (Tyrosine-326) pourrait jouer un rôle important [34].

Classiquement, la séquestration a été assimilée à un processus contribuant à la désensibilisation du β_2AR . Toutefois, l'inhibition de la séquestration n'affecte que très peu l'apparition de cette désensibilisation [22, 35]. Cet état de choses a été expliqué en invoquant le fait que la séquestration soustrayait à la surface cellulaire des récepteurs déjà découplés par suite de leur phosphorylation rapide. Il a donc été proposé que la séquestration participerait plutôt à un processus de resensibilisation. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré qu'une activité phosphatasique associée aux vésicules de séquestration est capable de déphosphoryler le β_2AR [36]. En outre, il a été récemment montré que l'inhibition de la séquestration retarde significativement la resensibilisation du β_2AR [35]. Ainsi, la séquestration pourrait

permettre la déphosphorylation du β_2AR favorisant le recyclage de récepteurs pleinement fonctionnels vers la membrane plasmique.

Palmitoylation

Tout comme la phosphorylation, la palmitoylation est une modification post-traductionnelle qui module la réactivité du récepteur β_2AR . En effet, la cystéine 341 du β_2AR humain est thio-estérifiée par un acide palmitique et la substitution d'une glycine à ce site (Gly $^{341}\beta_2AR$), en empêchant la palmitoylation, décroît significativement le couplage fonctionnel du récepteur [37]. Ce découplage du récepteur non palmitoylé, semblable à celui observé au cours de la désensibilisation, s'accompagne également d'une élévation du niveau de phosphorylation du récepteur [38]. En outre, la stimulation soutenue du Gly $^{341}\beta_2AR$ n'entraîne pas de désensibilisation rapide et ne provoque aucune élévation additionnelle du niveau de phosphorylation. Ces résultats nous ont permis de proposer que l'état de découplage constitutif du récepteur non palmitoylé résulterait de l'élévation de son niveau basal de phosphorylation [38]. Dans ce contexte, la palmitoylation apparaît comme une modification pouvant contribuer à la régulation de l'état de phosphorylation du β_2AR .

Contrairement à la myristylation et à la prénylation qui sont co-traductionnelles, la palmitoylation est une forme d'acylation qui est purement post-traductionnelle et qui peut être réglée. Une stimulation soutenue du récepteur entraîne, de fait, une augmentation de l'incorporation de [3H]-palmitate dans le récepteur, vraisemblablement due à une accélération du cycle palmitoylation/dépalmitoylation [38, 39]. Si, comme cela a été démontré pour la bactériorhodopsine [40], la palmitoylation du β_2AR favorise l'ancrage de sa queue cytoplasmique dans la membrane plasmique, la régulation de l'état de palmitoylation pourrait grandement influencer sur l'accessibilité des sites de phosphorylation qui y sont présents. Prenant en compte ces observations, un modèle de régulation concertée de la palmitoylation et de la phosphorylation au cours de la désensibilisation peut être proposé (figure 6).

RÉFÉRENCES

38. Moffett S, Mouillac B, Bonin H, Bouvier M. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human β_2 -adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys³⁴¹. *EMBO J* 1993; 12: 349-56.
39. Mouillac B, Caron M, Bonin H, Dennis M, Bouvier M. Agonist-modulated palmitoylation of β_2 -adrenergic receptor in Sf9 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 21733-7.
40. Moench SJ, Moreland J, Steward DH, Dewey TG. Fluorescent studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin. *Biochemistry* 1994; 33: 5791-6.
41. Bouvier M, Moffett S, Loisel TP, Mouillac B, Hébert T. La palmitoylation: une modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation des voies de signalisation couplées aux protéines G. *médecine/sciences* 1994; 10 (suppl. 1): 10-7.
42. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, De Blasi A, Kobilka BK, MacGregor C, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor: phosphorylation of the receptor and regulation of its mRNA level. *J Biol Chem* 1989; 264: 16786-92.
43. Hadcock JR, Ros M, Malbon CC. Agonist regulation of β -adrenergic receptor mRNA. Analysis in S49 mouse lymphoma mutants. *J Biol Chem* 1989; 264: 13956-61.
44. Nantel F, Marullo S, Krief S, Strosberg AD, Bouvier M. Cell-specific down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 13148-55.
45. Valiquette M, Bonin H, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β_2 -adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5089-93.
46. Valiquette M, Bonin H, Bouvier M. Mutation of tyrosine-350 impairs the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to the stimulatory guanine nucleotide binding protein without interfering with receptor down-regulation. *Biochemistry* 1993; 32: 4979-85.
47. Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. The human β_2 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 548-55.

Selon ce modèle, qui représente une variante du modèle présenté sur la figure 5, une activation soutenue du récepteur augmenterait le taux de renouvellement du palmitate sur la cystéine 341 facilitant ainsi l'accès de la queue cytosolique aux kinases régulatrices. Ainsi, l'élévation du niveau de phosphorylation résultant de cette accessibilité accrue serait responsable du découplage fonctionnel du récepteur.

Des cystéines équivalentes à la cystéine 341 du β_2 AR sont retrouvées dans un très grand nombre de RCPG. Un tel niveau de conservation suggère fortement que la palmitoylation puisse représenter un mécanisme de régulation généralisé pour cette famille de récepteurs [41]. La palmitoylation des récepteurs α_2A -adrénergique, dopaminergique D_1 et sérotoninergique 5-HT_{1B} a d'ailleurs été confirmée expérimentalement.

Régulation négative

La régulation négative du β_2 AR se définit par une diminution du nombre total de récepteurs. Une telle régulation à la baisse du nombre de récepteurs est un processus lent comparativement aux mécanismes réglant la réactivité du récepteur qui ont été décrits plus haut. La régulation négative se développe sur plusieurs heures et n'est souvent maximale qu'après 24 heures de stimulation continue par de fortes doses d'agoniste. De plus, celle-ci n'est que très lentement réversible après l'interruption du stimulus et une synthèse protéique *de novo* est essentielle à la restauration du nombre initial de récepteurs.

Des mécanismes agissant aussi bien sur la régulation de l'expression génique que sur le trafic intracellulaire et la dégradation du récepteur contribuent à la régulation négative du β_2 AR. Plusieurs études ont démontré que la régulation négative du nombre de β_2 AR s'accompagne d'une diminution des ARN messagers (ARNm) codant pour ce récepteur [42]. Cette diminution, qui se traduit par une réduction du taux de synthèse du récepteur, résulte d'une déstabilisation de l'ARNm dépendante de l'AMPc [43] (figure 3). La régulation à la baisse des ARNm joue très certainement un rôle important dans

la régulation négative mais ne peut l'expliquer entièrement. Dans certaines lignées cellulaires, la baisse du nombre de récepteurs apparaît simultanément ou même précède une diminution notable du niveau d'ARNm [42, 44].

Il est généralement admis que l'internalisation du β_2 AR, suivie de sa dégradation dans les lysosomes, contribue aussi à la régulation négative. Deux résidus tyrosines situés dans la queue cytoplasmique du récepteur semblent être impliqués dans ce processus. En effet, la substitution d'alanyl aux tyrosines-350 et 354 du β_2 AR atténue significativement sa régulation négative [45, 46]. La mutation de ces deux tyrosines est cependant sans effet sur la séquestration du β_2 AR [45], suggérant qu'elles exercent leur rôle en aval du processus d'internalisation. Des tyrosines positionnées de façon similaire dans la queue cytoplasmique d'autres récepteurs ont aussi été impliquées dans l'internalisation et le trafic cellulaire. Dans le cas du récepteur de l'IgF2 et du mannose-6-phosphate, il a été proposé que ces tyrosines interagissent avec des protéines du manteau de clathrine, connues sous le nom d'adaptines, facilitant ainsi le ciblage vers les endosomes. L'existence d'une telle interaction avec des protéines analogues reste à démontrer pour le β_2 AR. On ne connaît pas non plus les signaux cellulaires qui favorisent la voie de la dégradation au détriment de la voie du recyclage lors d'une stimulation de plusieurs heures.

Autres récepteurs β -adrénergiques et généralisation

Un grand nombre de RCPG sont soumis à des processus de régulation comme la désensibilisation. L'importante conservation structurale, de même que le partage par ces récepteurs d'un nombre limité de voies de signalisation, suggèrent que des mécanismes voisins de ceux présentés pour le β_2 AR pourraient être impliqués dans leur régulation. En particulier, la phosphorylation des récepteurs par des kinases de la famille des GRK ou par des kinases activées par des seconds messagers semble être un mécanisme largement

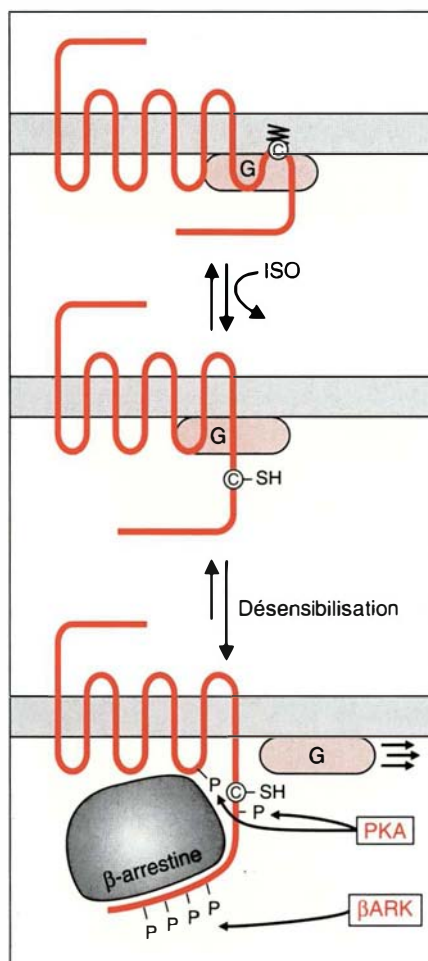


Figure 6. **Modèle de régulation concertée de la palmitoylation et de la phosphorylation du β_2 AR.** Selon ce modèle, l'activation du récepteur par l'isoprotérénol (ISO) augmenterait le taux de renouvellement du palmitate, favorisant l'accès de la queue cytosolique aux kinases régulatrices. L'activation continue du récepteur augmenterait le renouvellement du palmitate sur la cystéine 341, facilitant l'accès aux kinases. L'élévation résultant du niveau de phosphorylation serait responsable du découplage fonctionnel du récepteur.

m/s n° 6, vol. 11, juin 95

répandu. De même, la régulation des taux d'ARNm, ainsi que l'internalisation et la dégradation, semblent en jeu dans la régulation de plusieurs récepteurs.

Un examen attentif de la séquence de plusieurs RCPG révèle cependant que les domaines impliqués dans la régulation du β_2 AR ne sont pas conservés de façon stricte. Par exemple, malgré une identité de séquence de plus de 40 %, les trois sous-types de récepteurs β -adrénergiques se distinguent largement par leurs sites potentiels de phosphorylation. En particulier, le β_3 AR ne compte aucun site potentiel de phosphorylation par la PKA ou la BARK. Cette absence de sites de phosphorylation s'accompagne d'une résistance presque complète du β_3 AR à la désensibilisation rapide [46]. En outre, et contrairement à ce qui est observé pour le β_2 AR, la stimulation pendant plusieurs heures du β_3 AR ne conduit pas à une accélération de sa dégradation. L'absence de tyrosines équivalentes aux tyrosines 350 et 354 du β_2 AR dans la queue cytosolique du β_3 AR pourrait bien rendre compte de cette différence. Ainsi, il semble que la régulation négative observée pour ce récepteur dépende entièrement de la régulation des taux d'ARNm [43]. Ces dernières observations démontrent clairement que différents récepteurs peuvent être soumis à des processus de régulation distincts. Lorsqu'on considère des RCPG appartenant à d'autres sous-groupes, des différences structurales encore plus importantes pourraient spécifier d'autres modes de régulation.

En conclusion, la désensibilisation de la voie de signalisation β_2 -adrénergique résulte de la conjugaison de plusieurs mécanismes agissant sur la réactivité, l'expression et la dégradation du β_2 AR. Ces mécanismes, qui contribuent aux diverses phases de la désensibilisation, peuvent jouer un rôle plus ou moins important selon le niveau et la durée de la stimulation. Des mécanismes similaires ou identiques participent très certainement aux processus de désensibilisation de plusieurs autres récepteurs. Toutefois, l'absence d'une conservation stricte des domaines de régulation permet de prédire qu'à chaque récepteur correspondrait probablement un profil spécifique de régulation ■

Summary

The β_2 -adrenergic receptor, study model for agonist-induced desensitization

Approximately 80 % of known hormones and neurotransmitters mediate their effects through the activation of G protein linked receptors. Propagation of the signal *via* these receptors is under the control of tight regulatory processes which confer high degrees of plasticity to these transduction pathways. In particular, desensitization of many receptors is known to occur in response to their own activation or following stimulation of other signalling pathways. Such desensitization can be extremely rapid (seconds-minutes) and transient or else can develop slowly (hours-days) over the course of sustained stimulation. Over the last few years, the molecular mechanisms underlying these regulatory processes have slowly begun to be unravelled and are known to involve post-translational modifications of the receptors as well as gene expression regulation. In this review, we have used the β_2 -adrenergic receptor, which can be considered in many instances as prototypical of the G protein-coupled receptors, as a model to describe the various mechanisms contributing to agonist-promoted desensitization. Although, receptor-specific mechanisms undoubtedly exist, those described for the β_2 -adrenergic receptor form the basis for a general model which can be used as a framework for the study of the regulation of other G protein-coupled receptors.

TIRÉS À PART

M. Bouvier.