



Mise en évidence d'une interaction fonctionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur du peptide vasoactif urotensine II : implication potentielle dans la fonction astrocytaire.

Thomas Lefebvre

► To cite this version:

Thomas Lefebvre. Mise en évidence d'une interaction fonctionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur du peptide vasoactif urotensine II : implication potentielle dans la fonction astrocytaire.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rouen, 2010. Français. NNT: . tel-02351434

HAL Id: tel-02351434

<https://normandie-univ.hal.science/tel-02351434>

Submitted on 10 Jan 2020

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

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

Thèse

Présentée à la faculté des sciences et Techniques de l'Université de Rouen
en vue de l'obtention du Doctorat ès Sciences

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Neurosciences

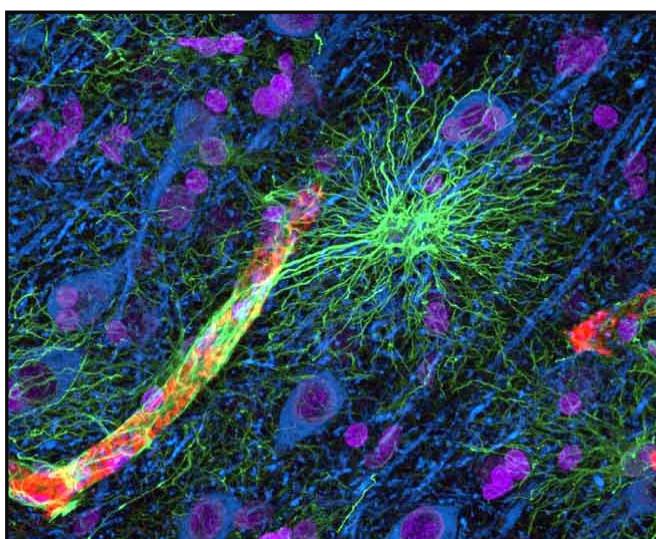
Mise en évidence d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur du peptide vasoactif urotensine II : implication potentielle dans la fonction astrocytaire

par

Thomas Lefebvre

Soutenue le 4 Mars 2010 devant le Jury composé de :

Mr R. Vázquez	Assistant Professor à l'Université de Cordoba, Espagne	Rapporteur
Mr L. Prézeau	Chargé de Recherche au CNRS, Montpellier	Rapporteur
Mr B. Gonzalez	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examinateur
Mr X. Leroy	Chef de Projet chez Actelion Pharmaceuticals, Bâle, Suisse	Examinateur
Mme M-C. Tonon	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examinateur
Mme H. Castel	Chargé de Recherche à l'Inserm, Rouen	Directeur



Thèse

Présentée à la faculté des sciences et Techniques de l'Université de Rouen
en vue de l'obtention du Doctorat ès Sciences

Discipline : Biologie Cellulaire

Spécialité : Neurosciences

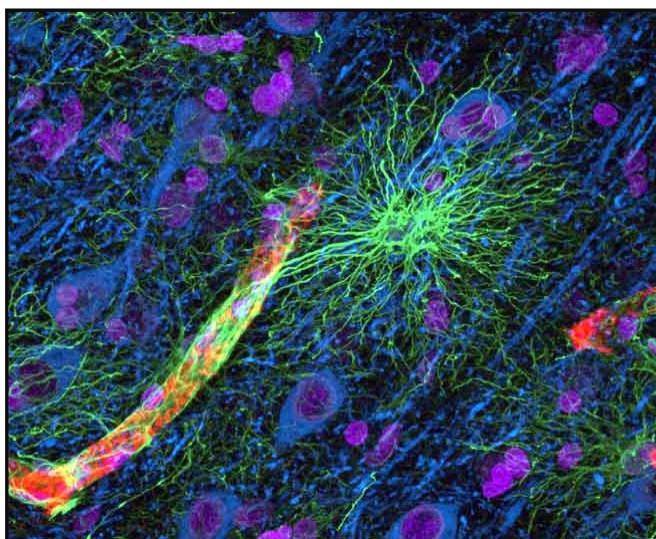
Mise en évidence d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur du peptide vasoactif urotensine II : implication potentielle dans la fonction astrocytaire

par

Thomas Lefebvre

Soutenue le 4 Mars 2010 devant le Jury composé de :

Mr R. Vázquez	Assistant Professor à l'Université de Cordoba, Espagne	Rapporteur
Mr L. Prézeau	Chargé de Recherche au CNRS, Montpellier	Rapporteur
Mr B. Gonzalez	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examinateur
Mr X. Leroy	Chef de Projet chez Actelion Pharmaceuticals, Bâle, Suisse	Examinateur
Mme M-C. Tonon	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examinateur
Mme H. Castel	Chargé de Recherche à l'Inserm, Rouen	Directeur



A la mémoire de ma grand-mère

A mes parents et mon frère

A Emilie et Théo

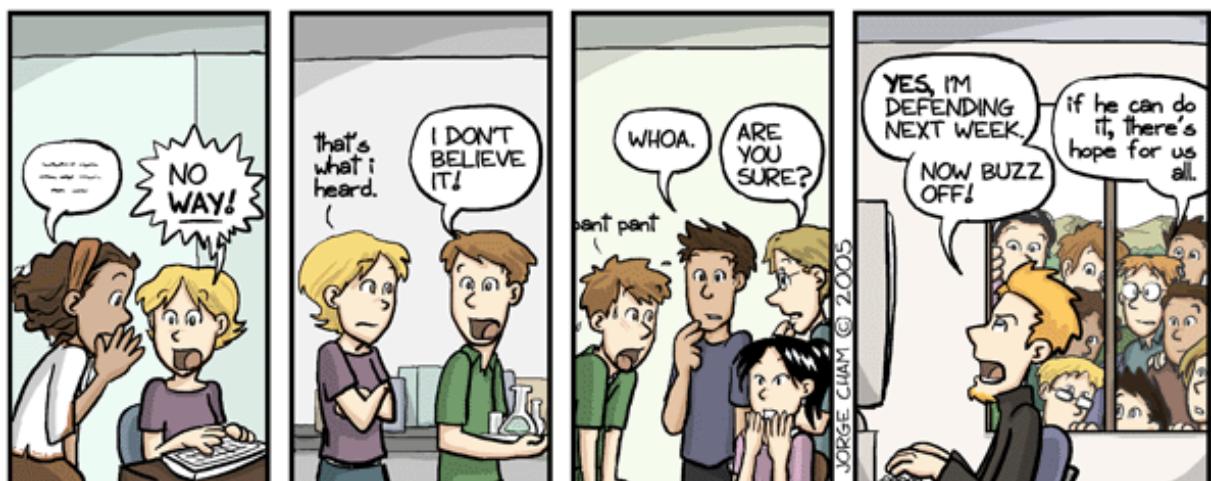
Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire - Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Unité Inserm 413.

Durant la préparation de ma thèse, j'ai bénéficié d'une allocation co-financée par l'Inserm et la Région Haute-Normandie. Je tiens à les en remercier.

Ce travail n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide généreuse de plusieurs organismes :

- *L'Institut de la Santé et de la Recherche Médicale*
- *Le Conseil Régional de Haute-Normandie*
- *L'Université de Rouen*
- *La Plate Forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie*
- *L'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides*
- *L'Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement*
- *L'Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons*

Sommaire



Liste des Articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale	17
Liste des Figures	19
Liste des Tableaux	21
Liste des Abréviations	23
Résumé	27
Summary	31
Introduction	37
Chapitre 1 : Le système GABAergic	41
1. Structure du récepteur GABA _A	41
1.1. Sous-unités du récepteur GABA _A	43
1.2. Assemblage et stoechiométrie des sous-unités du récepteur GABA _A	45
1.3. Topologie du canal chlore associé au récepteur GABA _A	51
1.3.1. Ouverture du canal	53
1.3.2. Caractéristiques électrophysiologiques du courant évoqué par le GABA	55
1.4. Localisation des sous-unités	57
2. Modulation de la fonction du récepteur GABA _A	61
2.1. Régulation allostérique par les ligands extracellulaires	61
2.1.1. Les benzodiazépines	61
2.1.2. Les anesthésiques	63
2.1.3. Les neurostéroïdes	67
2.1.4. L'éthanol	69
2.1.5. Les ions	71
2.2 Régulation par des mécanismes intracellulaires	71
2.2.1. La phosphorylation du récepteur GABA _A	71
2.2.2. Régulation du récepteur GABA _A par des protéines partenaires	79
Chapitre 2 : Le système urotensinergique	89
1. L'urotensine II et l' <i>urotensin II-related peptide</i>	89
1.1. Les gènes de l'UII et de l'URP	90
1.2. Structures de l'UII, de l'URP et de leur précurseur	91
1.3. Localisations périphérique et centrale de l'UII et de l'URP	93
1.3.1. Localisation périphérique	93
1.3.2. Localisation dans le système nerveux central	95
2. Le récepteur de l'urotensine II ou UT	96

2.1. Caractérisation de l'UT	96
2.2. Structure et pharmacologie de l'UT	98
2.2.1. Structure	98
2.2.2. Pharmacologie.....	101
2.3. Désensibilisation et internalisation de l'UT	104
2.4. Localisation de l'UT	105
2.4.1. Localisation périphérique.....	105
2.4.2. Localisation dans le SNC	109
2.5. Voies de transduction associées à l'UT	109
3. Activités biologiques de l'UII	111
3.1. Effets cardiovasculaires de l'UII	111
3.1.1. Effets <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i>	111
3.1.2. Effets <i>in vivo</i>	113
3.1.3. UII et maladies vasculaires	114
3.1.4. UII et maladies du myocarde	115
3.2. Effets sur le système immunitaire	115
3.3. Effets rénaux de l'UII	116
3.4. Effets sur le système endocrine.....	117
3.5. Effets comportementaux	117
Objectif de l'étude.....	121
Matériels et Méthodes	125
1. Culture cellulaire	125
1.1. Cultures d'astrocytes de Rat	125
1.2. Cultures de neurones en grain du cervelet	127
1.3. Cocultures astrocytes/neurones en grain	128
1.4. Lignées cellulaires.....	128
2. Biologie moléculaire	129
2.1. Plasmides recombinants	129
2.2. Sous-clonage des ADNc, transformation et amplification	130
3. Transfection des lignées cellulaires par nucléofection.....	132
4. Enregistrements électrophysiologiques.....	132
4.1. Technique du patch-clamp	132
4.2. Instrumentation	133
4.3. Configurations d'enregistrement	135

4.4. Microélectrodes de mesure et solutions	136
4.5. Analyse des données électrophysiologiques	137
5. Mesures des variations de la concentration cytosolique de calcium	137
5.1. Flexstation	137
5.2. Imagerie dynamique – Système MétaFluor	138
6. Microphotographies des cultures primaires – Système MétaMorph.....	139
7. Mesure du métabolisme des polyphosphoinositides	140
8. Mesure de la formation d'AMPc	140
9. Immunocytochimie et immunohistochimie.....	141
9.1. Protocoles d'immunocytochimie	141
9.1.1. Expression de l'UT et du récepteur GABA _A dans les co-cultures astrocytes/neurones	141
9.1.2. Localisation subcellulaire de l'UT et du récepteur GABA _A dans la lignée CHO	143
9.1.3. Internalisation du récepteur GABA _A	143
9.2. Protocole d'immunohistochimie	144
9.2.1. Préparation des tranches organotypiques de cervelet	144
9.2.2. Expression de l'UT et du récepteur GABA _A dans les tranches de cervelet	144
9.3. Acquisition et analyse des images confocales	145
10. Synthèse peptidique	146
11. Analyses statistiques	147
Résultats	151
Article I : Effect of GABA _A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes	151
Article II : Tight promiscuity between the GABA _A receptor and the G protein-coupled receptor for urotensin II induced long-term inhibition of the GABAergic activity. Relevance for astrocyte plasticity	161
Discussion	241
1. Caractérisation des voies de couplage de l'UT	241
2. L'activation du récepteur GABA _A inhibe le couplage de l'UT aux protéines G _s /G _q	244
3. Caractérisation de l'expression de l'UT et du récepteur GABA _A	246
4. L'activation de l'UT inhibe la fonction du récepteur GABA _A dans les astrocytes	247

5. Caractérisation des mécanismes impliqués dans l'interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre l'UT et le récepteur GABA _A dans une lignée CHO	249
6. Caractérisation des séquences d'interaction entre l'UT et le récepteur GABA _A	254

Conclusion – Perspectives	259
--	-----

Travaux scientifiques annexes

Article III : Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons

Références Bibliographiques
--

Liste des Articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale

Publications originales dans des revues à Comité de lecture

- Lefebvre, T.**, Desrues, L., Lecointre, C., Diallo, M., Dubessy, C., Leprince, J., Tonon, M.C. and Castel, H. Tight promiscuity between the GABA_A receptor and the G protein-coupled receptor for urotensin II induces long-term inhibition of the GABAergic activity. Relevance for astrocyte plasticity. *J. Cell. Biol.* (*submitted*).
- Lefebvre, T.**, Vaudry, D., Desrues, L., Falluel-Morel, A., Aubert, N., Fournier, A., Tonon, M.C., Vaudry, H., Gonzalez, B.J. and Castel, H. (2009) Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, **110**, 976-989.
- Desrues, L., **Lefebvre, T.**, Diallo, M., Gandolfo, P., Leprince, J., Chatenet D., Vaudry H., Tonon, M.C. and Castel, H. (2008) Functional interaction between the urotensin II receptor and the GABA_A receptor in rat cortical astrocytes. *Peptides*, **29**, 727-734.
- Castel, H., Vaudry, D., Mei, Y.A., **Lefebvre, T.**, Basille, M., Desrues, L., Fournier, A., Vaudry, H., Tonon, M.C. and Gonzalez, B.J. (2006) The delayed rectifier channel current IK plays a key role in the control of programmed cell death by PACAP and ethanol in cerebellar granule neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1070**, 173-179.

Articles de revue

- Botia, B., Castel, H., **Lefebvre, T.**, Seyer, D., Bénard, M., Falluel-Morel, A., Aubert, N., Cosette, P., Jouenne, T., Fournier, A., Vaudry, H., Gonzalez, B.J. and Vaudry, D. (2007) Effets du PACAP et de l'éthanol sur la survie des neurones en grain du cervelet de rat *in vitro* et *in vivo*: étude des mécanismes d'action. *Cahiers de l'Ireb*, **18**, 41-47.

Actes de Congrès (Extended abstract)

- Castel, H., **Lefebvre, T.**, Desrues, L., Diallo, M., Dubessy, C., Leprince, J., Vaudry, H., Gandolfo, P. and Tonon, M.C. (2009) Functional cross-talk between the urotensin II and the GABA_A receptors in astrocytes. Potential involvement in cell proliferation. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. *Glia*, **57**, S72.
- Jarry, M., Schouft, M.T., Liger, F., Marquet, B., Joseph, B., **Lefebvre, T.**, Tonon, M.C., Meijer, L., Castel, H. and Gandolfo, P. (2009) Effects of a series of meriolines, a new class of cyclin dependent kinase inhibitors, on glioma cell proliferation. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. *Glia*, **57**, S168.
- Lecointre, C., Morin, F., Jarry, M., Le Joncourt, V., Desrues, L., Schouft, M.T., **Lefebvre, T.**, Vaudry, H., Tonon, M.C., Langlois, O., Proust, F., Gandolfo, P. and Castel, H. (2009) Role of the urotensin II and UT protein partners in glioma cell migration. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. *Glia*, **57**, S168.
- Raoult, E., Roussel, B., **Lefebvre, T.**, Maubert, E., Vivien, D., Fournier, A., Vaudry, H., Vaudry, D. and Galas, L. (2007) Effect of PACAP on tPA expression and release in cultured rat granule cells. 8th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. *J. Mol. Neurosc.*, **33**, 335.
- Desrues, L., **Lefebvre, T.**, Diallo, M., Gandolfo P., Chatenet, D., Leprince, J., Vaudry, H., Tonon, M.C. and Castel, H. (2007) Bi-directional functional interaction between the urotensine II receptor and the ligand-gated ion channel receptor GABA_A in rat astrocytes. 8th European Meeting Glial cells in Health and Disease. *Neuron Glia Biology*, **3**, S167.
- Diallo, M., Castel, H., Jarry, M., Desrues, L., **Lefebvre, T.**, Chatenet, D., Leprince, J., Compère, V., Ouafik, L., Fontaine, M., Schouft, M.T., Vaudry, H., Tonon, M.C. et Gandolfo, P. (2007) Urotensin II and urotensin II-related peptide regulate normal astrocyte activity. Potential involvement in glioma proliferation. 8th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. *Neuron Glia Biology*, **3**, S161-S162.
- Castel, H., Mei, Y.A., Vaudry, D., Basille, M., **Lefebvre, T.**, Fournier, A., Tonon, M.C., Vaudry, H. and Gonzalez B.J. (2005) The delayed rectifier channel current I-k plays a key role in the control of programmed cerebellar granule cell death by PACAP and ethanol. 7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. *Regulatory Peptides*, **130**, 158.

Liste des Figures

Figure 1	Représentation schématique de la communication cellulaire au sein de l'unité neurovasculaire	38
Figure 2	Localisation chromosomique et arbre phylogénétique des sous-unités du récepteur GABA _A	42
Figure 3	Représentation schématique de la structure du récepteur GABA _A	44
Figure 4	Assemblage des sous-unités du récepteur GABA _A	48
Figure 5	Caractéristiques du canal chlore associé au récepteur GABA _A	50
Figure 6	Séquences des sous-unités α, β et/ou γ humaines impliquées dans la liaison de l'agoniste au récepteur	52
Figure 7	Caractéristiques électrophysiologiques du récepteur GABA _A	54
Figure 8	Représentation schématique du site de fixation des modulateurs allostériques du récepteur GABA _A	62
Figure 9	Sites réels de phosphorylation identifiés sur la boucle i ₂ des sous-unités β et γ humaines	72
Figure 10	Adressage et regroupement des sous-unités du récepteur GABA _A	78
Figure 11	Régulation de l'endocytose et du recyclage des récepteurs GABA _A ...	84
Figure 12	Evolution des gènes des familles de peptides urotensinergiques et somato-statinergiques	90
Figure 13	Représentation schématique de l'isopeptide UII et de son paralogue URP chez l'Homme, le Rat, la Souris et le Poulet	91
Figure 14	Structure du récepteur UT humain	98
Figure 15	Modélisation moléculaire de la liaison de l'UII sur le récepteur UT ...	100
Figure 16	Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets vasculaires de l'UII	108
Figure 18	Protocoles de culture d'astrocytes et de neurones en grain du cervelet	126
Figure 19	Description du poste d'électrophysiologie et des configurations utilisées au cours des expériences de patch-clamp	134
Figure 20	Analyse subcellulaire du profil d'expression de l'UT et des sous-unités du récepteur GABA _A	146
Figure 21	Représentation schématique des différentes voies de couplage de l'UT modulées par l'activation du récepteur GABA _A	244

Figure 22	Microphotographies illustrant la proportion, la distribution et la morphologie des astrocytes et/ou des neurones en mono- et co-cultures astrocyte/neurone	248
Figure 23	Représentation schématique du mécanisme d'inhibition de l'activité du récepteur GABA _A par l'UT	252

Liste des Tableaux

Tableau 1	Séquences impliquées dans l’assemblage des sous-unités du récepteur GABA _A	47
Tableau 2	Distribution des sous-unités du récepteur GABA _A dans le cerveau de Rat adulte	58/59
Tableau 3	Modulateurs allostériques principaux de la fonction GABAergique ...	64
Tableau 4	Protéines d’interaction aux sous-unités du récepteur GABA _A	86
Tableau 5	Pourcentages d’identité entre les séquences peptidiques de la préproUII et du préproURP	92
Tableau 6	Localisation de l’UII et de l’URP chez les Mammifères.....	94
Tableau 7	Localisations centrale et périphérique de l’UT chez les Mammifères..	106
Tableau 8	Effets périphériques de l’UII chez les Mammifères	112
Tableau 9	Effets centraux de l’UII chez les rongeurs.....	118
Tableau 10	ensemencement des cellules et choix des supports selon le type d’expérience	127
Tableau 11	Lignées cellulaires et ADNc utilisés selon le type d’expérience	130
Tableau 12	Amorces, enzymes de restriction et vecteurs utilisés pour les différentes constructions de récepteurs	131
Tableau 13	Composition des solutions intracellulaire et extracellulaires utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques	136
Tableau 14	Anticorps utilisés pour les immunomarquages	142

Liste des abréviations

17PA	3 alpha,5 alpha-17-phenylandrost-16-en-3-ol
3 α ,5 α -THPROG	3 alpha,5 alpha-tétrahydroprogesterone
3 α ,5 β -THPROG	3 alpha,5 beta-tétrahydroprogesterone
3 α ,5 α -THDOC	3 alpha,5 alpha-tétrahydrodéoxycorticostérone
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HT _{3/4}	Récepteur de la 5-HT de type 3 ou 4
AC	Adénylyl cyclase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKAPs	<i>A-kinase anchoring proteins</i>
Al ³⁺	Aluminium
Ala	Alanine
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AOBS	<i>Accousto-optical beam splitter</i>
AP	<i>Adaptor protein</i>
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messager
Asp	Acide aspartique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
β -CCE	3-carboethoxy- β -carboline
BAPTA	<i>1,2-bis-(2-aminophenoxyethane) N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
BIG2	<i>Brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2</i>
BiP	<i>Binding protein</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
BZ	Benzodiazépine
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _c	Concentration cytosolique de calcium
CAML	<i>Calcium-modulating cyclophilin ligand</i>
CamKII	Protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante
CC-L	Canal calcique de type L
Cd ²⁺	Cadmium
CHO	<i>Chinese hamster ovary cell</i>
CHO-UT	CHO exprimant stablement l'UT humain
Cl ⁻	Chlore
C _{term}	Carboxy-terminal
CO ₂	Dioxyde de carbone
Co ²⁺	Cobalt
COS-7	<i>Cercopithecus aethiops kidney cells</i>
CST	Cortistatine
Cu ²⁺	Cuivre
Cys	Cystéine
DA	Dopamine
DAG	Diacyglycérol
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole

DHEA	Déhydroépiandrostérone DIP	<i>Dynamin inhibitory peptide</i>
DIV	Jours de culture (<i>Days in vitro</i>)	
DMCM	Méthyl 6,7-diméthoxy-4-éthyl-β-carboline-3-carboxylate	
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	
DTM	Domaine transmembranaire	
E	Stade embryonnaire	
e ₁ , e ₂ , e ₃	Boucles extracellulaires 1, 2, 3	
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>	
EGFR	Récepteur de l'EGF	
EGTA	Acide tétraacétique d'éthylène-glycol	
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	
ERM	Erzine/Radixine/Moésine	
EtOH	Ethanol	
FERM	<i>Four-point-one-ERM</i>	
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>	
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>	
GABA	Acide γ-aminobutyrique	
GABA _A	Récepteur de l'acide γ-aminobutyrique de type A	
GABA _B	Récepteur de l'acide γ-aminobutyrique de type B	
GABARAP	<i>GABA_A receptor associated protein</i>	
GC	Guanylyl cyclase	
GDP	Guanosine diphosphate	
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	
Glu	Glutamate	
Gln	Glutamine	
Gly	Glycine	
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique	
GODZ	<i>Golgi-specific DHHC – Asp-His-His-Cys – zinc finger protein</i>	
GRIF	<i>GABA_A receptor interacting factor-1</i>	
GRIP	<i>Glutamate receptor interacting protein</i>	
GST	Glutathion-S-transférase	
GTP	Guanosine triphosphate	
HAP-1	<i>Huntingtin associated protein 1</i>	
HBSS	<i>Hanks'balanced salt solution</i>	
HEK293	<i>Human embryonic kidney 293 cell</i>	
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	
Hg ²⁺	Mercure	
His	Histidine	
HTRF	<i>Homogeneous time-resolved fluorescence</i>	
i ₁ , i ₂ , i ₃	Boucles intracellulaires 1, 2	
i.c.v.	Intracérébroventriculaire	
i.d.	Intradermique	
IBMX	Isobutyl méthyl xanthine	
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane	
Ile	Isoleucine	
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate	
IPs	Inositols phosphates	
i.v.	Intraveineuse	
K _{Ds}	Constante de désensibilisation	

K_{off}	Constante de déactivation
K_{on}	Constante d'activation
Leu	Leucine
Ln ³⁺	Lanthanides
Lys	Lysine
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Met	Méthionine
MLC-2	<i>Myosin light chain-2</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
Mpb	Mega paires de bases
MTA	<i>Material transfert agreement</i>
nA	Nano ampères
ND	Non déterminé
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
Ni ²⁺	Nickel
NO	Monoxyde d'azote
NOs	NO synthase
NSF	<i>N-ethylameimide-sensitive factor</i>
N _{term}	Amino-terminal
OR	Récepteur opioïde
P	Stade postnatal
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDI	Protéine disulfide isomérase
PFA	Paraformaldéhyde
pGln	Pyroglutamine
Phe	Phénylalanine
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIPs	Polyphosphoinositides
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PKM	Fragment catalytique de la PKC
PLC	Phospholipase C
Plic-1	<i>Proteins linking integrin-associated protein and cytoskeleton</i>
PP	Protéine phosphatase
PPSI	Potentiel post-synaptique inhibiteur
PRIMACEN	Plate-forme régionale de recherche en imagerie cellulaire de Haute-Normandie
PRIP	<i>Phospholipase C-related, catalytically inactive proteins</i>
PRL	Prolactine
Pro	Proline
pS	Pico siemens
PTK	Protéine tyrosine kinase

RACK-1	<i>Receptor for activated C-kinase</i>
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
Rho	<i>Ras homolog gene family</i>
RGABA _A	Récepteur GABA _A
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	<i>Room temperature</i>
SBF	Sérum bovin fœtal
SCAM	<i>Substituted cysteine accessibility method</i>
SENR	<i>Sensory epithelium neuropeptide-like-receptor</i>
Ser	Sérine
shARN	<i>Small hairpin ARN</i>
SHP-2	<i>Src homology 2-containing tyrosine phosphatase</i>
siARN	<i>Small interfering ARN</i>
SNC	Système nerveux central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SS	Somatostatine
SSTR	Récepteur somatostatinergique
TBPS	t-butylbicyclophosphorothionate
TCA	Acide trichloroacétique
Te ³⁺	Terbium
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> ou thyréostimuline
Tyr	Tyrosine
UCE	<i>Urotensin-converting enzyme</i>
UII	Urotensin II
URP	<i>UII-related peptide</i>
UT	<i>Urotensin II receptor</i>
Val	Valine
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Zn ²⁺	Zinc

Résumé —

Longtemps considérés comme de simples cellules de soutien dans le système nerveux central (SNC), les astrocytes jouent en réalité un rôle clef au sein de l'unité neurovasculaire dans la régulation métabolique, la transmission synaptique et/ou la neurogenèse et la synaptogenèse, *via* l'expression de nombreux récepteurs/canaux ioniques/transporteurs et la libération de facteurs autocrine et paracrine. A la suite de lésions cérébrales, en particulier après un épisode ischémique, l'astrocytose réactionnelle qui se met alors en place pourrait être contrôlée par des facteurs vasoactifs localement surexprimés. L'urotensine II (UII) et son paralogue *l'urotensin II-related peptide* (URP) sont deux neuropeptides cycliques considérés comme les facteurs endogènes vasoactifs les plus puissants caractérisés à ce jour. Les travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence la présence des ARNm codant l'UT et la protéine dans les astrocytes corticaux de Rat en culture, et ont montré que l'UII active les voies G_q -PLC-Ca²⁺, $G_{i/o}$, ou des canaux calciques de type T, et stimule la prolifération astrocytaire. Les différences d'affinité de l'UT pour l'UII et l'URP, et ses différents couplages pourraient s'expliquer par des phénomènes de plasticité dépendants de l'état de prolifération astrocytaire, eux-mêmes sous-tendus par des interactions physiques et/ou fonctionnelles avec d'autres récepteurs. Un exemple de plasticité "récepteur" a été suggéré pour le récepteur GABA_A, dont l'expression fonctionnelle à la membrane plasmique est inversement proportionnelle à la capacité de prolifération des astrocytes, après un accident vasculaire cérébral ou dans des tumeurs astrocytaires malignes. Ces données suggèrent donc que le récepteur GABA_A est récepteur "répresseur" de prolifération cellulaire. Une étude montrant que l'UII régule la fonction GABAergique dans les neurones d'Aplysie, permettait d'envisager l'existence d'une interaction entre les effets mitogènes de l'UII et répresseur du GABA sur la prolifération astrocytaire en conditions physiopathologiques. Notre projet de recherche a donc consisté *i)* à montrer que l'UT et le récepteur GABA_A sont co-exprimés dans

les astrocytes et à rechercher l’existence d’une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre les deux récepteurs dans ce modèle cellulaire, *ii)* à caractériser le mécanisme d’action de l’UII sur l’activité GABAergique dans les astrocytes de cervelet en co-culture avec des neurones, et dans une lignée co-exprimant l’UT et les sous-unités du récepteur GABA_A humain, et *iii)* à identifier les séquences d’interaction permettant le rapprochement de l’UT au récepteur GABA_A, et sa régulation fonctionnelle.

Sur des astrocytes corticaux de Rat en culture, nous avons montré pour la première fois que l’UII entraîne une augmentation concentration-dépendante de la production d’AMPc. Cet effet est totalement bloqué par le SQ22536, un inhibiteur d’adénylyl cyclase, alors qu’il est exacerbé en présence d’un inhibiteur de PKA, le H89, suggérant l’existence d’un rétrocontrôle négatif du système adénylyl cyclase/AMPc/PKA sur la fonction de l’UT. De plus, l’UII stimule de façon concentration-dépendante le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs), un effet qui est fortement inhibé en présence de H89. L’ensemble de ces données suggère donc que l’UII entraîne la production d’AMPc et l’activation d’une PKA, qui pourrait catalyser le changement de couplage de l’UT des protéines G_s aux protéines G_i d’une part, et G_q d’autre part. Enfin, nous avons démontré que l’activation du récepteur GABA_A inhibe les effets de l’UII sur le métabolisme des PIPs ainsi que sur la production d’AMPc, révélant l’existence d’une régulation négative de la fonction urotensinergique par le récepteur GABA_A dans les astrocytes.

Des expériences de double marquage réalisées sur des tranches de cervelet de Rat révèlent que l’UT et les sous-unités γ_1 et γ_2 du récepteur GABA_A sont principalement co-exprimés au sein de fibres astrocytaires dans la couche moléculaire ainsi que dans les cellules de Purkinje. Sur des co-cultures astrocytes/neurones de cervelet, l’UT et les sous-unités γ_1 et γ_2 sont majoritairement exprimés dans les astrocytes. Dans ce modèle de co-culture, nous avons montré que l’UII inhibe la dépolarisation membranaire et atténue de manière concentration-dépendante l’amplitude du courant chlore évoqué par l’agoniste du récepteur GABA_A, l’isoguvacine. Sur les lignées CHO exprimant stablement l’UT humain (CHO-UT) et transitoirement transfectées par différentes combinaisons en ADNc codant différentes sous-

unités du récepteur GABA_A humain, l'UII *i)* inhibe significativement l'amplitude du courant Cl⁻ dès la concentration de 10⁻¹³ M ($\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 > \alpha_2\beta_3\gamma_1 > \alpha_2\beta_1\gamma_1$), *ii)* est d'autant plus puissant que la sous-unité γ est associée à la sous-unité β_3 du complexe GABAergique ($\alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 \gg \alpha_2\beta_3 \approx \alpha_2\beta_1$), et *iii)* devient inactif lorsque les sous-unités γ ne sont pas associées au récepteur GABA_A. Sur les cellules CHO-UT exprimant le complexe $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, l'UII, perfusée pendant seulement 1 s, est déjà capable d'entraîner une diminution du courant, un effet qui est corrélé aux effets du DMCM, un modulateur allostérique direct de la fonction des complexes GABAergiques composés des sous-unités γ . A l'aide d'un système d'imagerie dynamique, nous montrons que l'UII entraîne une augmentation irréversible de la concentration cytosolique de calcium ([Ca²⁺]_c) alors l'URP stimule transitoirement la [Ca²⁺]_c dans les CHO-UT. De même, l'UII et l'URP inhibent irréversiblement et réversiblement le courant chlore évoqué par l'isoguvacine, respectivement. Nous montrons, que l'antagoniste peptidique [Orn⁵]-URP, se comporte comme un agoniste partiel de l'UT sur la [Ca²⁺]_c et sur la fonction GABAergique, capable de bloquer les effets prolongés de l'UII sur ces deux effecteurs. De plus, le palosuran, un antagoniste non-peptidique développé par Actelion, ne présente pas d'activité propre, abolie totalement l'effet de l'UII sur la [Ca²⁺]_c mais en revanche, inhibe significativement la fonction GABAergique, mimant ainsi les effets de l'UII.

L'effet de l'UII, caractérisé par une inhibition rapide (<1 s après l'application d'UII), suivie d'une diminution progressive de l'amplitude du courant au cours du temps, n'est pas relayé par les protéines G associées à l'UT. En revanche, l'inhibition observée à long-terme est partiellement dépendante du calcium, des kinases/phosphatases intracellulaires, et met en jeu la dynamine, une protéine classiquement impliquée dans le processus d'internalisation du récepteur GABA_A. Nous confirmons en effet que sur des CHO exprimant l'UT et les sous-unités $\alpha_2\beta_3^{HA}\gamma_2$, l'UII provoque l'internalisation du récepteur GABA_A. A l'aide de 4 mutants de l'UT délétés dans la partie C-terminale de 19 (UT₃₇₀), 38 (UT₃₅₁), 57 (UT₃₃₂) et 70 (UT₃₁₉) acides aminés, respectivement, nous montrons que lorsque le récepteur GABA_A est co-exprimé avec le mutant tronqué UT₃₇₀, l'effet rapide de l'UII est fortement réduit et l'inhibition à long terme du courant chlore est retardée, suggérant que le fragment distal 370-

389 relaye l'effet rapide et direct de l'UII. Lorsque le récepteur GABA_A est co-exprimé avec les mutants UT₃₅₁, UT₃₃₂ ou UT₃₁₉, l'UII est sans effet sur la régulation du courant GABA_A, indiquant que la séquence comprise entre les acides aminés 351 et 370 joue un rôle majeur dans le processus d'internalisation du récepteur GABA_A.

L'ensemble de ces données démontre pour la première fois l'existence d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur couplé aux protéines G de l'UII, associée particulièrement à la plasticité astrocytaire. L'activation de l'UT inhibe rapidement la fonction GABAergic, conduisant à l'extinction progressive du récepteur GABA_A à la membrane plasmique *via* son internalisation. Les effets de l'UII, partiellement indépendants des voies de signalisation classiquement associées aux RCPG, suggèrent l'existence d'un couplage "direct" entre le fragment C-terminal de l'UT et la sous-unité γ associée au complexe récepteur GABA_A. De fait, la perte du rôle répresseur du récepteur GABA_A engendrée par le peptide vasoactif UII pourrait jouer un rôle majeur dans la prolifération astrocytaire au cours de lésions cérébrales.

Summary –

Considered as passive cells in the central nervous system, astrocytes play a pivotal role in the neurovascular unit controlling metabolic support to neurons, synaptic function and/or neurogenesis and synaptogenesis, *via* the expression of a plethora of receptors/ion channels/transporters and the release of autocrine/paracrine factors. Reactive astrogliosis observed during cerebral lesions such as ischemia, could be controlled by vasoactive factors locally over-expressed. Urotensin II (UII) and its paralog, the urotensin II-related peptide (URP), are two neuropeptides currently considered as the most potent vasoactive factors characterized. Previous studies conducted in our team have showed that Rat cortical astrocytes expressed functional UT receptors, and that UII activates G_q/PLC/Ca²⁺ and G_{i/o} transduction pathways, T-type calcium channels, and stimulates cell proliferation. The distinct UT affinities for UII and URP, and the UT-associated different couplings to G-proteins would be explained by receptor plasticity regulating by astrocyte proliferation, involving cross-talk of UT with other receptors. Receptor plasticity has ever been suggested for the GABA_A receptor, whose functional expression at the plasma membrane is inversely proportional to the degree of astrocyte proliferation, after a stroke or in malignant astrocytes. These data suggest that the GABA_A receptor works as a repressor of cell proliferation. A study demonstrating that the UII modulates the GABAergic function in Aplysia neurons suggested a possible interaction between the mitogenic effects of UII and the repressor activity of the GABA_A receptor on astrocyte proliferation in physiopathological conditions.

Thus, this project aimed at *i*) demonstrating that UT and the GABA_A receptor are co-expressed in astrocytes and investigating the existence of a bidirectional functional interaction between the two receptors, *ii*) characterizing the mechanism of the UII-induced inhibition of the GABAergic function in astrocytes from cerebellum co-cultured with neurons, and in a cell line coexpressing the human UT and GABA_A receptor subunits, and *iii*) identifying the

sequences involved in UT and the GABA_A receptor interaction, and in the regulation of the GABA_A receptor current.

In cultured cortical astrocytes, we showed for the first time that UII binding induces a dose-dependant stimulation of cAMP production. This effect is suppressed by the specific AC antagonist SQ22536, and sustained in the presence of the PKA inhibitor H89, suggesting the existence of a negative feed-back of the AC/cAMP/PKA system on UT functioning. Moreover, UII induces a concentration-dependant stimulation of the PIPs turnover, reduced in the presence of H89. These data suggest that UII stimulates cAMP formation and activates PKA, that would provoke a switch of UT coupling from G_s to G_i on the one hand, and G_q, on the other hand. We demonstrated that activation of the GABA_A receptor counteracts the effects of UII on both PIPs turnover and cAMP production, thus providing the evidence that UT function can be regulated by the GABA_A receptor in astrocytes.

Double labeling studies performed on slices from Rat cerebellum revealed that UT and the γ_1 and γ_2 subunits of the GABA_A receptor mainly co-localize in glial processes in the molecular layer and in Purkinje cells. On astrocyte/neuron co-cultures from cerebellum, UT and the γ_1 subunit are predominantly expressed in Purkinje cells and astrocytes. In this co-culture model, we showed that UII reduces the membrane depolarization and induces a dose-dependant inhibition of the chloride current evoked by the GABA_A receptor agonist, isoguvacine. On a CHO cell line that stably express the human UT (CHO-UT) and transiently transfected with different combinations of cDNA encoding GABA_A receptor subunits, UII *i*) significantly inhibits the chloride current from the concentration of 10^{-13} M ($\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 > \alpha_2\beta_3\gamma_1 > \alpha_2\beta_1\gamma_1$), *ii*) is more potent than the γ subunit is associated to the β_3 subunit in the GABAergic complex ($\alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 \gg \alpha_2\beta_3 \approx \alpha_2\beta_1$), and *iii*) fails to inhibit the chloride current in the absence of gamma subunits. In CHO-UT expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits, a 1-sec UII perfusion inhibited the current, and this effect is correlated to the effect of DMC, a direct allosteric modulator of GABAergic complexes containing a γ subunit. Intracellular calcium mobilization assays on CHO-UT showed that UII provokes an irreversible intracellulaire calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) increase whereas URP transiently stimulates the $[Ca^{2+}]_c$. UII

and URP irreversibly and reversibly inhibits the isoguvacine-evoked current, respectively. We demonstrated that the peptide antagonist [Orn⁵]-URP is a partial agonist both on the [Ca²⁺]_c and the GABAergic function, and blocks the prolonged effects of UII on each assays. The non-peptidic antagonist palosuran developed by Actelion, fails to modulate the [Ca²⁺]_c, totally abolishes the UII-induced [Ca²⁺]_c increase but mimics the effect of UII on the GABAergic function, *i.e.* a significant inhibition of the chloride current.

The effect of UII, characterized by a fast inhibition (<1s after UII perfusion), followed by a run-down of the Iso-evoked current, is not relayed *via* G-proteins coupled to UT. However, the long-term UII-induced inhibition partially involves calcium, intracellular kinases/phosphatases and dynamin, a protein known to mediate the GABA_A receptor internalization. On CHO-UT transfected with $\alpha_2\beta_3^{\text{HA}}\gamma_2$ subunits, we confirmed that UII induces the internalization of the GABA_A receptor. We also generated four C-terminal truncated mutants of the UT receptor lacking the 19 (UT₃₇₀), 38 (UT₃₅₁), 57 (UT₃₃₂) and 70 (UT₃₁₉) amino acids, respectively, and showed that the co-expression of UT₃₇₀ with the GABA_A receptor strongly reduces the fast UII-induced inhibition, and delays the long-term depression of the chloride current. This suggests that the rapid and direct effect of UII involved the distal fragment 370-389 of the UT C-terminus. When the GABA_A receptor is co-expressed with UT₃₅₁, UT₃₃₂ or UT₃₁₉, UII totally failed to inhibit the chloride current, indicating that the 351-370 UT sequence plays a major role in the internalization of the GABA_A receptor.

Taken together, these data demonstrates for the first time the existence of a bidirectional functional interaction between the GABA_A receptor and the G protein-coupled receptor for UII, associated with astrocyte plasticity. The UII mechanisms, which do not entirely require classical GPCR-associated signaling pathways, may involve a more “direct” cross-talk between the C-terminal fragment of UT and the γ subunit associated to the GABA_A complex. Thus, the extinction of the GABA_A receptor expressed at the plasma membrane triggered by the vasoactive peptide UII, would play a major role in astrocyte proliferation following cerebral lesions.

Summary

Introduction



Introduction

Les astrocytes constituent la principale population de cellules gliales du système nerveux central (SNC). Depuis le milieu du XIXe siècle, où le tissu nerveux non-neuronal fut qualifié de « glue » par Virchow, et jusqu'à ces dernières années, les astrocytes ont été considérés comme des éléments de soutien relativement passifs ; une population de cellules homogènes capables de réguler l'homéostasie du réseau neuronal, de relayer la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhésion ou de facteurs trophiques, de contrôler la maturation neuronale et synaptique, et d'apporter le soutien métabolique indispensable au cerveau (Wang and Bordey, 2008). Avec le développement des outils électrophysiologiques, de biologie cellulaire, d'imagerie ou de génétique, il apparaît que les astrocytes représentent en réalité une population cellulaire hétérogène, pour laquelle on observe l'émergence de nouvelles fonctions, *i.e.* l'organisation de l'architecture synaptique, le contrôle de la prolifération des cellules souches neurales et la régulation du flux sanguin cérébral (Wang and Bordey, 2008). Bien que l'hypothèse de changements locaux de l'activité cérébrale couplés à la perfusion ait été apportée par Roy et Sherrington en 1890, ce n'est qu'au cours des 10 dernières années que l'interface entre le SNC et le système vasculaire – l'unité neurovasculaire – a été explorée et caractérisée. En effet, les astrocytes dits « protoplasmiques » de la substance grise, hautement polarisés, sont capables de contacter ou de projeter vers les synapses et/ou les vaisseaux sanguins cérébraux, ce qui leur permet d'intégrer et de co-réguler les activités synaptiques et les apports métaboliques (Figure 1).

Au sein de l'unité neurovasculaire, la perception de ces activités par les astrocytes s'opère *via* l'activation de canaux ioniques tels que **le récepteur GABA_A**, de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) ou de transporteurs, responsables d'une dépolarisation membranaire et/ou d'une augmentation de la concentration cytosolique de calcium ($[Ca^{2+}]_c$). A l'heure actuelle, on estime que cette dynamique intracellulaire calcique représente le mode d'excitabilité des astrocytes relayé par des RCPG

spécifiquement couplés aux protéines G_{q/11} (Nimmerjahn, 2009), relayant la production d'inositols 1,4,5 trisphosphate (IP₃) et l'activation des pools de calcium du réticulum endoplasmique (RE) (Figure 1). En conditions physiopathologiques, *i.e.* l'hémorragie sous-arrachnoïdienne, l'ischémie cérébrale, l'hypertension ou les lésions traumatiques, la réaction des astrocytes, ou « astrogliose réactionnelle », se manifeste *via* des altérations caractéristiques de l'expression et de l'organisation des filaments gliaux, une hypertrophie

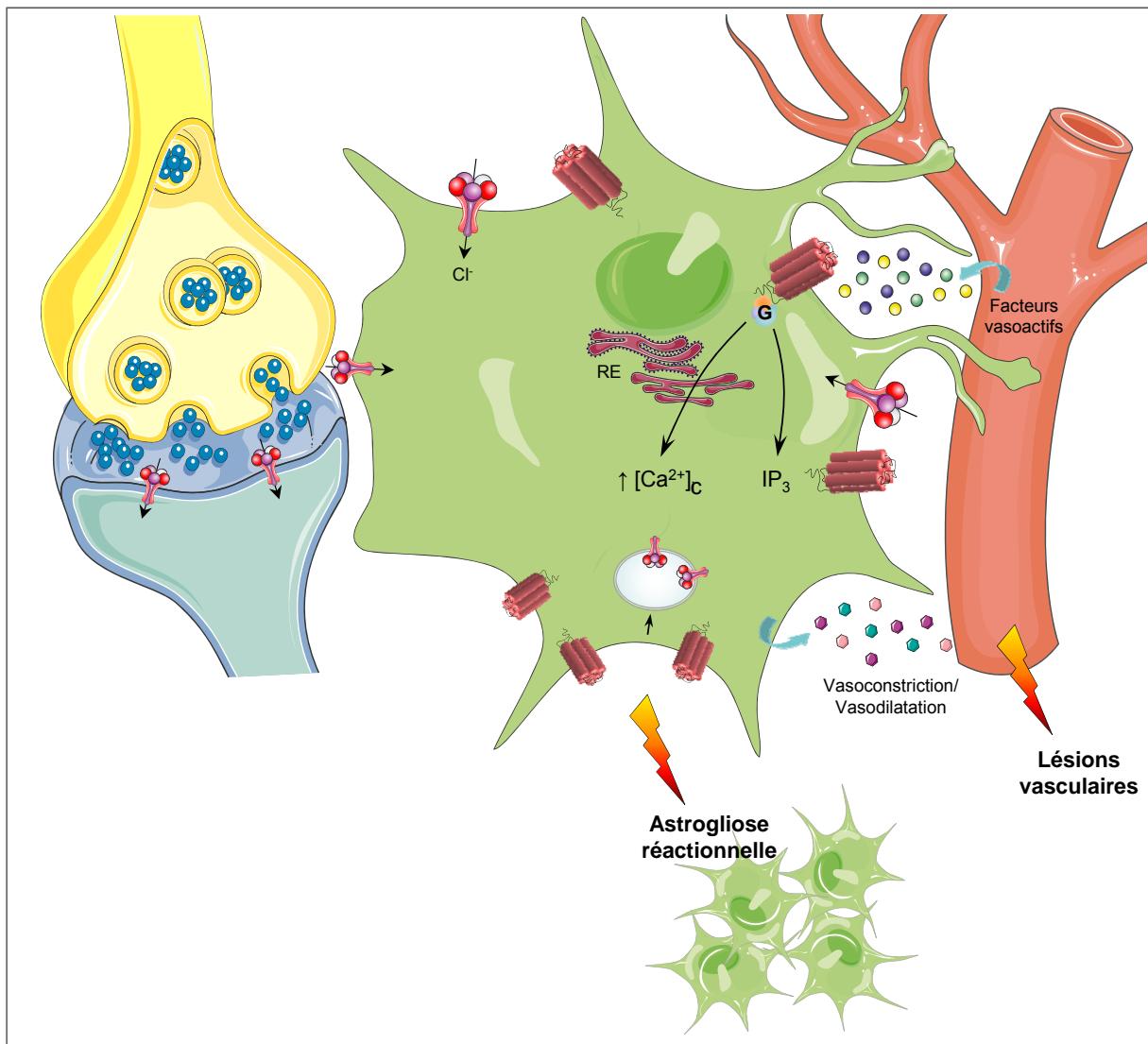


Figure 1 : Représentation schématique de la communication cellulaire au sein de l'unité neurovasculaire. Dans l'unité neurovasculaire, les astrocytes, acteurs majeurs de la synapse tripartite et en contact avec les capillaires sanguins, assurent de nombreuses fonctions, de la régulation de l'activité synaptique ou du soutien métabolique aux neurones, à la régulation du débit sanguin cérébral. Ces mécanismes d'action mettent en jeu classiquement des récepteurs couplés aux protéines G_q, et l'activation de la voie de signalisation IP₃/Ca²⁺. Lors d'une atteinte du SNC, d'ordre vasculaire, traumatique ou neurodégénératif, la réactivité astrocytaire, ou "astrogliose réactionnelle", est l'élément clé du remodelage tissulaire. Au cours de la prolifération astrocytaire, la disparition fonctionnelle du récepteur GABA_A déjà démontrée pourrait impliquer des récepteurs de peptides vasoactifs.

cellulaire progressive, la prolifération et enfin, dans certains cas, la formation d'une glie cicatricielle. L'origine de ces astrocytes proliférants n'est pas bien comprise et pourrait inclure les astrocytes matures qui ré-entrent dans le cycle cellulaire, ainsi que des progéniteurs neuraux du parenchyme local ou des zones ventriculaires, considérés eux-aussi comme des astrocytes indifférenciés. Parmi les acteurs de régulation de l'astroglose réactionnelle, les **stimulateurs vasoactifs de la prolifération cellulaire** tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'endothéline jouent un rôle majeur. Dans ces conditions de prolifération astrocytaire, la disparition de l'expression fonctionnelle de l'aquaporine 4 (Koyama and Tanaka, 2010) ou du **récepteur GABA_A** (Tateishi *et al.*, 2007) semble associée aux effets de peptides vasoactifs surexprimés après des lésions post-ischémiques.

L'urotensine II (UII) est le peptide vasoactif le plus puissant connu à ce jour (Douglas *et al.*, 2004a), dont les propriétés mitogènes sur les astrocytes ont été très récemment mises en évidence dans notre équipe (Jarry *et al.*, *in press*). Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'existence d'une plasticité-récepteur dans les astrocytes, impliquant une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre le récepteur du peptide vasoactif UII et le récepteur GABA_A.

Chapitre I : Le Système GABAergique



Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC et joue de ce fait un rôle majeur dans la modulation de l'activité neuronale. Les effets du GABA sont principalement relayés par 2 types de récepteurs, dénommés récepteurs GABA_A et GABA_B. Le récepteur GABA_A est un récepteur ionotropique, perméable aux ions chlore, tandis que le récepteur GABA_B est un RCPG hétéromérique, formé par l'assemblage de deux sous-unités GABAB1 (GB1a ou GB1b) et GABAB2 (Kaupman *et al.*, 1997 ; Goei *et al.*, 1998 ; Grifa *et al.*, 1998), qui contrôle l'activité de l'adénylyl cyclase et régule l'ouverture de canaux calciques et potassiques (Bormann, 1988 ; Bowery, 1993 ; Misgeld *et al.*, 1995 ; Rabow *et al.*, 1995 ; Kaupmann *et al.*, 1997 ; Bowery and Brown, 1997).

1. Structure du récepteur GABA_A

Le récepteur GABA_A est un complexe hétéro-oligomérique composé de 5 sous-unités protéiques dont l'organisation pseudo-symétrique délimite un pore central perméable majoritairement aux ions chlore. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs-canaux à "boucle cystéine", appelée ainsi en raison de la présence d'un motif conservé contenant une paire de cystéines reliée par un pont-disulfure, dans la région N-terminale (N_{term}) extracellulaire de chaque sous-unité (Schofield *et al.*, 1987 ; Simon *et al.*, 2004). Chez les vertébrés, cette famille de canaux ioniques regroupe les récepteurs glycinergiques (Barker and Ransom, 1978 ; Grenningloh *et al.*, 1987 ; Breitinger and Becker, 2002), les récepteurs cholinergiques nicotiniques (Noda *et al.*, 1983 ; Corringer *et al.*, 2000 ; Lukas and Bencherif, 2006), le récepteur sérotoninergique 5-HT₃ (Maricq *et al.*, 1991 ; Davies *et al.*, 1999 ; Thompson and Lummis, 2006), ainsi qu'un canal ionique spécifiquement activé par le zinc (Zn²⁺) (Davies *et al.*, 2003). Tous ces récepteurs sont des pentamères dont les sous-unités possèdent entre elles au minimum 30% d'homologie de séquence en acides aminés.

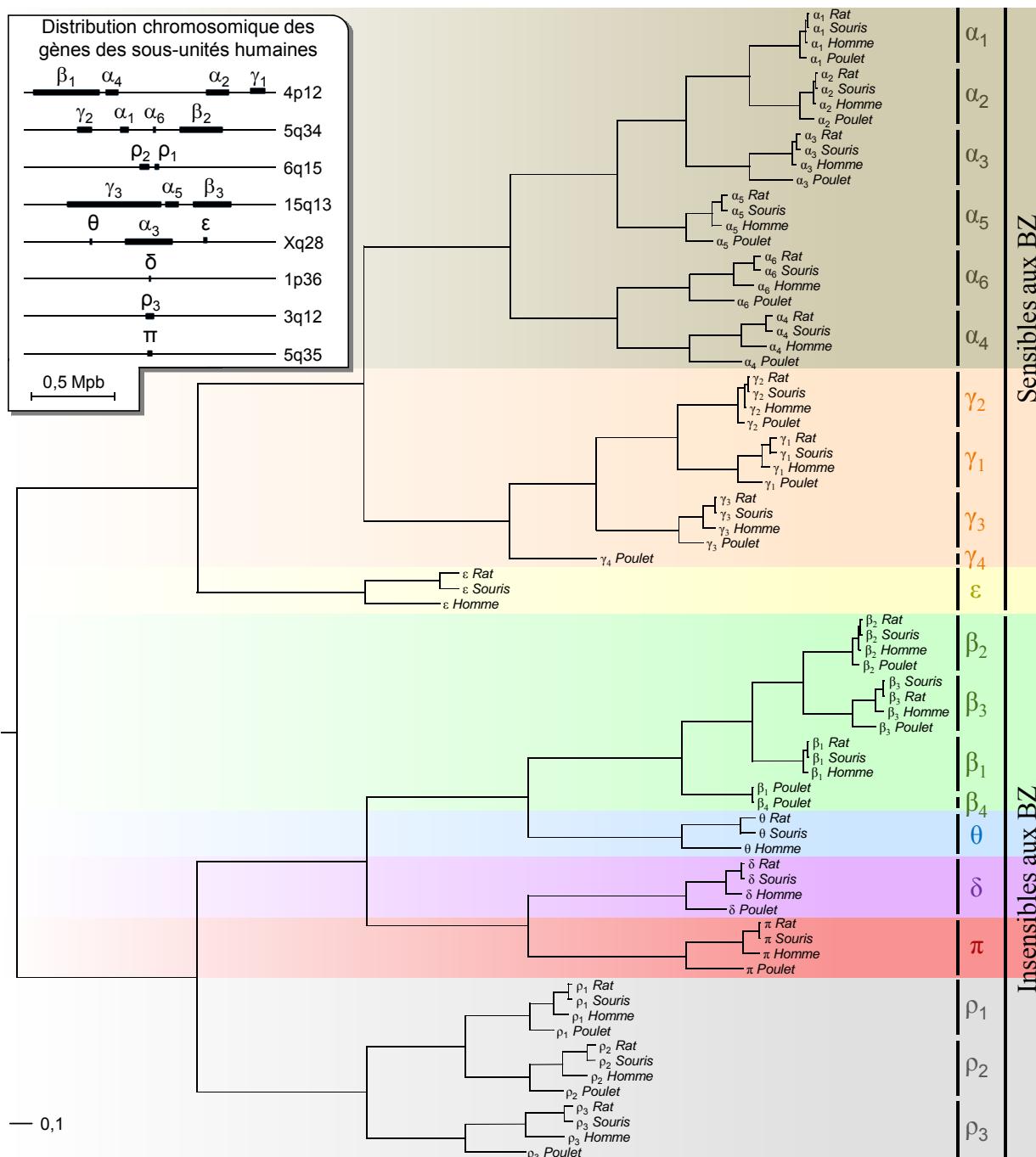


Figure 2 : Localisation chromosomique et arbre phylogénétique des sous-unités du récepteur GABA_A. Les séquences des sous-unités humaines, de Rat, de Souris et de Poulet sont extraites des bases de données du *National Center for Biotechnology Information*. L’arbre phylogénétique a été construit à l’aide du logiciel ClustalX selon la méthode du *neighbour joining*, et a ensuite été mis en forme à l’aide du logiciel TreeView. L’arbre se présente sous forme de deux clades, l’un constitué des sous-unités sensibles (α , γ et ϵ), l’autre des sous-unités non sensibles (β , θ , δ , π et ρ) aux benzodiazépines (BZ). La barre d’échelle représente 0,1 substitution par nucléotide. Dans l’encadré est représentée la distribution chromosomique des gènes codant les différentes sous-unités humaines. La plupart des sous-unités sont regroupées au sein de mêmes portions de gènes sous forme de *clusters* résultant de duplications de gènes et de divergences, au cours de l’évolution. La barre d’échelle représente 0,5 Mega paires de bases (Mpb).

1.1. Sous-unités du récepteur GABA_A

Le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau de bœuf a conduit aux premières caractérisations moléculaires des sous-unités du récepteur GABA_A et ainsi au clonage des deux premières sous-unités dénommées α et β (Sigel and Barnard, 1984 ; Schofied *et al.*, 1987). Les résultats du séquençage complet du génome humain (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004) suivi d'une analyse *in silico* (Simon *et al.*, 2004), permettent de conclure à l'existence, chez les Mammifères, de 19 gènes codant des sous-unités distinctes du récepteur GABA_A, réparties en 8 classes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π et ρ_{1-3}). Les différentes classes possèdent généralement 20 à 30% d'identité de séquence en acides aminés, contre 70 à 80% entre les isoformes de chaque classe (Figure 2) (Barnard *et al.*, 1998 ; Hevers and Luddens, 1998 ; Bonnert *et al.*, 1999 ; Darlison *et al.*, 2005). La diversité moléculaire au sein des isoformes de sous-unités est encore accrue par le processus d'épissage alternatif, qui permet de générer des formes longues (L) et courtes (S) des sous-unités α_5 (Kim *et al.*, 1997), α_6 (Korpi *et al.*, 1994), β_2 (Harvey *et al.*, 1994), β_3 (Kirkness and Fraser, 1993), β_4 (Bateson *et al.*, 1991), γ_2 (Whiting *et al.*, 1990 ; Kofuji *et al.*, 1991) et γ_3 (Poulsen *et al.*, 2000). L'arbre phylogénétique des séquences de vertébrés révèle qu'une sous-unité ancestrale d'un pseudo-récepteur GABA_A a donné naissance à deux clades classés en sous-unités (Figure 2), sensibles (α , γ et ϵ) ou non sensibles (β , θ , δ , π et ρ) aux benzodiazépines (BZ), des agents pharmacologiques exogènes modulateurs allostériques de la fonction GABAergique (Ortells and Lunt, 1995 ; Xue, 1998 ; Martyniuk *et al.*, 2007). De plus, l'analyse phylogénétique réalisée par Martyniuk *et al.* (2007) démontre que les sous-unités ϵ et θ , spécifiques des Mammifères (Davies *et al.*, 1997a ; Wilke *et al.*, 1997 ; Whiting *et al.*, 1997 ; Bonnert *et al.*, 1999), dérivent respectivement des sous-unités γ_4 et β_4 clonées chez les oiseaux, les reptiles et les poissons (Bateson *et al.*, 1991 ; Lasham *et al.*, 1991 ; Harvey *et al.*, 1993 ; Darlison *et al.*, 2005 ; Thode *et al.*, 2008). La majorité des sous-unités sont regroupées au sein de mêmes portions de gènes sous forme de *clusters* (Simon *et al.*, 2004). Ainsi, chez l'Homme, des tandems de gènes des sous-unités γ_1 - α_2 - α_4 - β_1 , β_2 - α_6 - α_1 - γ_2 , ρ_1 - ρ_2 , β_3 - α_5 - γ_3 et ϵ - α_3 - θ sont localisés sur les loci chromosomiques situés en 5q34, 15q13, 4p12, Xq28 et 6q15,

respectivement. En revanche, les gènes codant les sous-unités π , ρ_3 et δ sont quant à eux isolés, et localisés sur les loci chromosomiques 5q35, 3q12 et 1p36 (Figure 2) (Simon *et al.*, 2004).

Toutes les sous-unités possèdent un large domaine N_{term} extracellulaire constitué de 220 à 250 acides aminés, présentant 3 sites potentiels de N-glycosylation et une boucle peptidique formée par un pont disulfure reliant deux résidus cystéine conservés. Cette séquence est suivie de 4 domaines transmembranaires (DTM1-DTM4) hydrophobes structurés en hélice α , les DTM3 et DTM4 étant connectés par une large boucle intracellulaire variable (125 acides

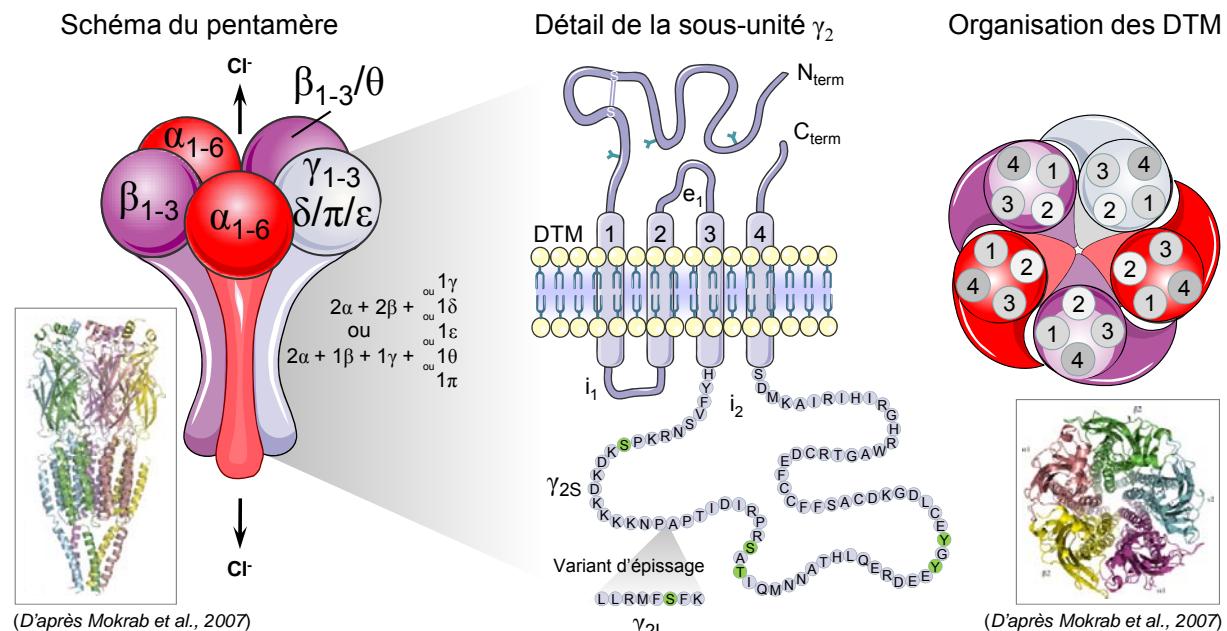


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du récepteur GABA_A. Le récepteur GABA_A est un complexe hétéropentamérique dont l’assemblage des 5 sous-unités, réparties en 7 classes (α , β , γ , δ , ϵ , θ et π), délimite un canal chlore central (Cl^-). En encadré, la modélisation moléculaire du pentamère gabaergique est basée sur la structure du récepteur nicotinique et a été réalisée à partir d’une composition en sous-unités de $2\alpha+2\beta_2+1\gamma_2$ (D’après Mokrab *et al.*, 2007). A l’heure actuelle, on estime que le récepteur GABA_A présente une stœchiométrie $2\alpha+2\beta+1\gamma/\delta/\epsilon/\theta/\pi$, mais l’existence de pentamères formés de $2\alpha+1\beta+1\gamma+1\epsilon/\theta/\pi$ n’est pas exclue. Chaque sous-unité se compose de 2 domaines amino- et carboxy-terminaux (N_{term} et C_{term}) extracellulaires et de 4 domaines transmembranaires (DTM) connectés par 2 boucles intracellulaires (i₁ et i₂) et une boucle extracellulaire (e₁). Le domaine N_{term} présente 3 sites potentiels de N-glycosylation et un pont disulfure entre 2 résidus cystéine conservés. La large boucle i₂ est la région qui présente les séquences les plus divergentes entre les sous-unités ; elle contient de nombreux sites consensus de phosphorylation par des sérine/thréonine et tyrosine kinases (en vert) et constitue le site majeur d’interaction avec les protéines régulatrices intracellulaires. Dans l’exemple est illustré la séquence en acides aminés de la boucle i₂ de la sous-unité γ_2 , comprenant ses 2 variants d’épissage, la sous-unité γ_2S (forme courte) et γ_2L (forme longue). Au sein du pentamère, le DTM2 de chacune des 5 sous-unités du récepteur GABA_A borde la paroi du canal ionique central, le DTM4 étant situé à l’extérieur, et les DTM1 et DTM3 adoptant une position contigüe. En encadré, la forme modélisée du récepteur, vue du dessus, représente le pentamère dans sa configuration inactivée (canal fermé) (D’après Mokrab *et al.*, 2007).

aminés), dont les séquences regroupent de nombreux sites consensus de phosphorylation et d'interaction spécifiques à des protéines cytosoliques régulatrices (Kittler and Moss, 2003 ; Lüscher and Keller, 2004). Les sous-unités possèdent une masse moléculaire apparente de 40 à 50 kDa, dont l'organisation spatiale est hautement conservée d'une sous-unité à l'autre (Figure 3).

1.2. Assemblage et stœchiométrie des sous-unités du récepteur GABA_A

L'observation en microscopie électronique de récepteurs purifiés à partir de cerveau de Porc, la comparaison de courbes dose-réponse réalisées sur des complexes recombinants formés de sous-unités sauvages et/ou mutées, et les études de Western blot ont permis de mettre en évidence l'association des différentes sous-unités du récepteur GABA_A en pentamère (Figure 3) (Nayeem *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 1996 ; Tretter *et al.*, 1997). De nombreuses études révèlent que l'assemblage de sous-unités α et β est suffisante pour former un pentamère fonctionnel (Sieghart, 1995 ; Bencsits *et al.*, 1999 ; Olsen and Sieghart, 2008). Cependant, il est désormais clairement établi que la grande majorité des récepteurs GABA_A se composent de 3 types de sous-unités, *i.e.* α et β associées à une ou plusieurs sous-unités γ , δ , ϵ , θ et/ou π (Olsen and Sieghart, 2009). Les premières études, basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, ont ainsi révélé que la combinaison la plus abondante rencontrée dans le cerveau était formée des sous-unités α_1 , β_2 et γ_2 (McKernan and Whiting, 1996 ; Sieghart and Sperk, 2002 ; Whiting, 2003 ; Benke *et al.*, 2004). L'hypothèse selon laquelle le récepteur GABA_A serait préférentiellement formé par l'assemblage de $2\alpha+1\beta+2\gamma$ est étayée par des expériences montrant que la mutation des acides aminés chargés localisés en bordure du canal, dans une région homologue des sous-unités α_3 , β_2 et γ_2 , modifie le degré de rectification sortante du courant évoqué par le GABA (Backus *et al.*, 1993). Des travaux démontrant la coexistence au sein d'un même complexe de 2 isoformes des sous-unités α , mais aussi γ ($\alpha_1\alpha_2$, $\alpha_1\alpha_3$, $\alpha_1\alpha_5$, $\alpha_1\alpha_6$, $\alpha_2\alpha_3$, $\alpha_3\alpha_5$, $\gamma_2\gamma_3$, $\gamma_2L\gamma_2S$), et d'une seule isoforme de la sous-unité β , confortent cette hypothèse (Duggan *et al.*, 1991 ; Lüddens *et al.*, 1991 ; Zezula and Sieghart, 1991 ; Mertens *et al.*, 1993 ; Khan *et al.*, 1994 ; Quirk *et al.*, 1994 ; Li and De

Blas, 1997 ; Fisher and Macdonald, 1997 ; Benke *et al.*, 2004 ; Minier and Sigel, 2004). Cette hypothèse est cependant controversée puisque des données obtenues par immunoprécipitation (Tretter *et al.*, 1997), *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET ; Farrar *et al.*, 1999), ou l'utilisation de sous-unités liées en tandem (Baumann *et al.*, 2001, 2002 ; Boileau *et al.*, 2005 ; Baur *et al.*, 2006) suggèrent une stœchiométrie de type $2\alpha+2\beta+1\gamma$, avec un agencement au sein du pentamère de type $\beta\alpha\gamma\beta\alpha$ (Baumann *et al.*, 2001, 2002). De plus, des données de co-immunoprécipitation rapportent l'existence de 2 isoformes de β au sein d'un même complexe (Li and De Blas, 1997 ; Jechlinger *et al.*, 1998). Dans de rares cas, 4 classes différentes peuvent être représentées au sein d'un même complexe, comme par exemple les sous-unités π et θ qui sont capables de s'assembler aux sous-unités α , β et γ (Bonnert *et al.*, 1999 ; Neelands and Macdonald, 1999 ; Neelands *et al.*, 1999 ; Sieghart and Sperk, 2002). Certaines sous-unités peuvent former des homomères fonctionnels, notamment les sous-unités β qui, lorsqu'elles sont assemblées, délimitent un canal chlore capable de s'ouvrir spontanément (Sigel *et al.*, 1989 ; Krishek *et al.*, 1996 ; Cestari *et al.*, 1996 ; Miko *et al.*, 2004), et les sous-unités ρ formant un récepteur de pharmacologie particulière (Hackam *et al.*, 1997 ; Koulen *et al.*, 1998). Des études réalisées sur des récepteurs recombinants exprimés par des ovocytes de Xénope ou sur des récepteurs natifs neuronaux ont toutefois démontré que ces sous-unités ρ pouvaient s'assembler à γ_2 et/ou α_1 et ainsi former des hétéromères de récepteurs fonctionnels (Qian and Ripp, 1999 ; Milligan *et al.*, 2004 ; Pan and Qian, 2005). Les différentes stœchiométries des sous-unités du récepteur GABA_A sont représentées sur la Figure 3.

L'assemblage des différentes sous-unités qui composent le récepteur GABA_A débute dans le RE et requiert la liaison de 3 protéines chaperons, *i.e.* la protéine de liaison aux chaînes lourdes des immunoglobulines BiP (*Binding Protein*), la calnexine et la protéine disulfide isomérase (Connolly *et al.*, 1996 ; Gorrie *et al.*, 1997 ; Kleizen and Braakman, 2004 ; Sarto-Jackson and Sieghart, 2008). La protéine BiP reconnaît les régions hydrophobes exposées, la calnexine se lie aux glycanes immatures et la disulfide isomérase catalyse la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines. Les sous-unités non assemblées

sont associées à la BiP et à la calnexine et sont retenues dans le RE grâce au signal de rétention Lys-Asp-Glu-Leu présent sur les protéines chaperons (cf § 2.2.2).

Des signaux d'assemblage ont pu être identifiés à l'interface des sous-unités elles-mêmes, permettant ainsi de limiter la diversité des complexes formés (Kittler *et al.*, 2000a, 2002). Les premières données dans ce domaine sont issues des travaux portant sur le variant d'épissage

Résidu(s) impliqué(s) dans l'assemblage	Sous-unité(s) partenaire(s)	Interface(s) (+)/(-)	Domaines homologues	Références
α_1 (Met ⁵⁴ –Trp ⁶⁸)	β_3	(–)	β_3 (52–66) γ_2 (67–81) γ_3 (70–84)	7
α_1 (Ile ⁵⁸ –Ser ⁶⁷)	β_3	ND	ND	11
α_1 Arg ⁶⁶	β_2	(–)	ND	1
α_1 Trp ⁶⁹	β_2	(+)	ND	10
α_1 (Met ⁸⁰ –Phe ¹⁰⁰)	γ_2 (91–104)	(+)	ND	6
α_1 Arg ⁹⁴	β_2	(+)	ND	10
β_3 (Met ⁵² –Asp ⁶⁶)	α_1	(–)	α_1 (54–68) γ_2 (67–81) γ_3 (70–84)	7
β_3 (Gly ⁷⁶ –Asp ⁸⁹)	α_1	(–)	γ_2 (91–104)	2
β_3 (Gly ¹⁷¹ , Lys ¹⁷³ , Glu ¹⁷⁹ , Arg ¹⁸⁰)	β_3	ND	ND	11
γ_2 Arg ⁴³	β_2	(+)	ND	3
γ_2 (Met ⁶⁷ –Trp ⁸¹)	α_1	(–)	α_1 (54–68) β_3 (52–66) γ_3 (70–84)	7
γ_2 (Tyr ⁸³ –Asn ⁹⁰)	$\alpha_1 + \beta_3$	(+)/(-)	ND	5
γ_2 (Ser ⁹¹ –Gly ¹⁰⁴)	α_1 (80–100)	(–)	β_3 (76–89)	5
γ_2 (Thr ¹²⁵ , Pro ¹²⁷)	β_3	(+)	ND	9
γ_2 Ser ¹⁷¹	ND	ND	ND	4
γ_3 (Ser ⁷⁰ –Thr ⁸⁴)	$\alpha_1 + \beta_3$	(+)/(-)	α_1 (54–68) β_3 (52–66) γ_2 (67–81)	7
γ_3 (Thr ⁸⁶ –Thr ⁹⁵)	$\alpha_1 + \beta_3$	(+)/(-)	γ_2 (83–90)	7
γ_3 (Ser ⁹⁴ –Gly ¹⁰⁷)	α_1	(–)	γ_2 (91–104)	8

Tableau 1 : Séquences impliquées dans l'assemblage des sous-unités du récepteur GABA_A. Des méthodes de mutagénèse dirigée, de délétion ou l'utilisation de sous-unités chimériques ont conduit à l'identification, au sein de la boucle N_{term} des sous-unités du récepteur GABA_A, de résidus ou de séquences impliqués dans l'assemblage des sous-unités entre elles. Ces acides-aminés sont localisés au niveau des interfaces d'assemblage (+) et (–). Des domaines homologues ont ainsi pu être mis en évidence entre les différentes isoformes. La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Bollan *et al.*, 2003b ; **2**, Ehya *et al.*, 2003 ; **3**, Hales *et al.*, 2005 ; **4**, Jin *et al.*, 2004 ; **5**, Klausberger *et al.*, 2000 ; **6**, Klausberger *et al.*, 2001 ; **7**, Sarto *et al.*, 2002a ; **8**, Sarto *et al.*, 2002b ; **9**, Sarto-Jackson *et al.*, 2006 ; **10**, Srinivasan *et al.*, 1999 ; **11**, Taylor *et al.*, 1999. ND, non déterminé.

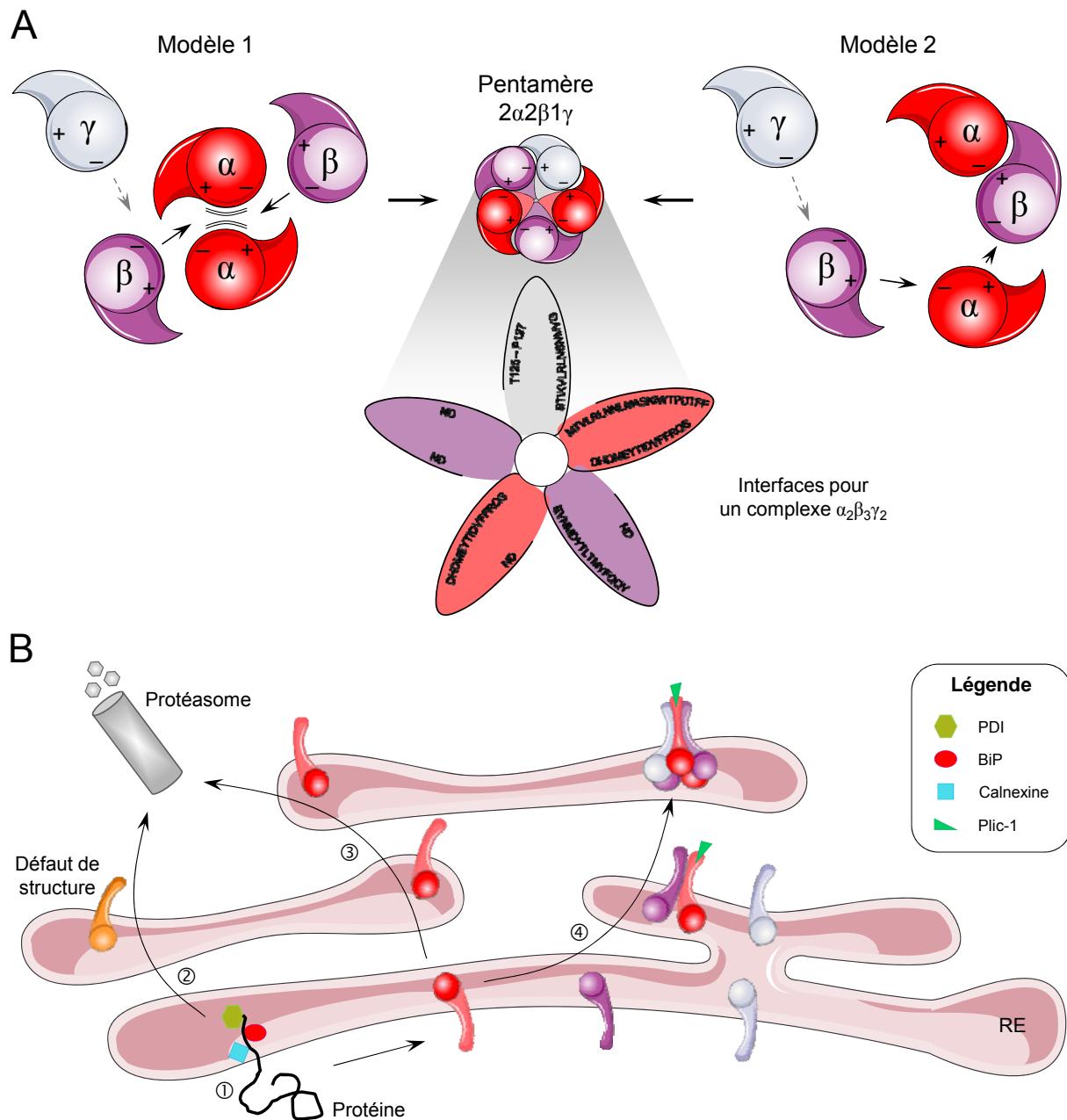


Figure 4 : Assemblage des sous-unités du récepteur GABA_A. A. Représentation schématique des deux modèles hypothétiques d'assemblage proposés par Sarto-Jackson et Sieghart, 2008. Selon un premier modèle (*gauche*), l'existence d'interactions entre deux sous-unités α permettrait d'abord aux interfaces (+) et (-) des sous-unités β de contacter respectivement les interfaces (-) et (+) des isoformes α , puis à une sous-unité γ de compléter le pentamère. Dans un second modèle (*droite*), l'assemblage du récepteur se ferait par contacts successifs entre les interfaces (+) d'un isoforme et (-) d'un autre isoforme, aboutissant ainsi consécutivement à un pentamère. Au sein de chaque interface ont été identifiées des séquences d'assemblage spécifiques, illustrées ici pour un complexe $\alpha_2\beta_3\gamma_2$. B. Représentation du mécanisme de contrôle de l'assemblage des sous-unités au sein du réticulum endoplasmique (RE). Dès sa translocation dans le RE, le repliement de la sous-unité néo-synthétisée est assisté par 3 protéines chaperon (①) : la BiP (*Binding Protein*), qui se lie aux régions hydrophobes, la calnexine, qui reconnaît les glycanes, et la protéine disulfide isomérase (PDI), responsable de la catalyse des ponts disulfure. Les protéines présentant des anomalies de structure sont écartées et dirigées vers le protéasome pour dégradation (②). Les protéines correctement repliées mais non-assemblées sont également dégradées par le protéasome (③). Les complexes pentamériques sont quant à eux stabilisés au sein du RE par leur association à la protéine Plic-1, et rejoindront ainsi l'appareil de Golgi (④). ND, non déterminé.

de la sous-unité α_6 (α_{6S}), démontrant qu'une délétion de 10 acides aminés dans la région N_{term}, empêche la formation d'un pentamère fonctionnel (Korpi *et al.*, 1994). Il s'est avéré que la région déletée (Glu⁵⁸-Gln⁶⁷) était nécessaire à l'assemblage et à la translocation de complexes $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ à la membrane plasmique. Par la suite, des études par mutagenèse dirigée, par délétion ou par utilisation de sous-unités chimériques, ont mis en évidence que l'assemblage des sous-unités s'opère dès le RE, et que ces sous-unités possèdent des séquences « signal » d'assemblage et d'adressage (Tableau 1). En référence au code appliqué à la structure de *l'acetylcholine binding protein* (Brejc *et al.*, 2001), on considère qu'au sein d'un pentamère, chaque sous-unité pourrait présenter deux interfaces d'assemblage, *i.e.* la face (+) étant au contact d'une des sous-unités adjacentes, la face (-) participant à l'interaction à l'autre sous-unité adjacente (Figure 4A). Ainsi, les résidus 54 à 68 situés à l'interface (-), une séquence hautement conservée entre toutes les sous-unités α , semblent interagir avec les sous-unités β (Klausberger *et al.*, 2000 ; Taylor *et al.*, 2000 ; Sarto *et al.*, 2002a), et les résidus 80 à 100 localisés au niveau de l'interface (+), permettent l'association à la sous-unité γ_2 (Figure 4A) (Klausberger *et al.*, 2001). Plus précisément, le résidu Gln⁶⁷ est déterminant pour l'assemblage de α_1 (-) avec β_3 (+) (Taylor *et al.*, 2000) et le résidu Arg⁶⁶ permet à α_1 de lier uniquement β_2 (Bollan *et al.*, 2003a, b). Réciproquement, au niveau de l'interface (-) des sous-unités β_2 et β_3 , les résidus 52 à 66 interviennent dans la liaison à α_1 (Taylor *et al.*, 1999 ; Klausberger *et al.*, 2000 ; Sarto *et al.*, 2002a) alors que les résidus 76 à 89 situés à l'interface (-) de β_3 entrent également en jeu dans l'interaction avec α_1 (Tableau 1) (Ehya *et al.*, 2003). Enfin, les acides aminés 67 à 81 et 91 à 104 de γ_2 , et 70 à 84 de γ_3 , localisés au niveau de l'interface (-), ainsi que les résidus 83 à 90 localisés à l'interface (+) de γ_2 , sont impliqués dans l'assemblage aux sous-unités α_1 et β_3 , respectivement (Tableau 1) (Klausberger *et al.*, 2000 ; Sarto *et al.*, 2002a, b). Le résidu Trp⁸² de γ_2 situé à l'interface (-) semble indispensable pour l'interaction avec les sous-unités α_1 et β_2 (Teissere and Czajkowski, 2001), et il apparaît que les résidus Trp⁶⁹ et Trp⁹⁴, communs à toutes les sous-unités, sont indispensables pour la formation du pentamère (Srinivasan *et al.*, 1999). Deux hypothèses ont été proposées par Sarto-Jackson et Sieghart (2008) pour expliquer

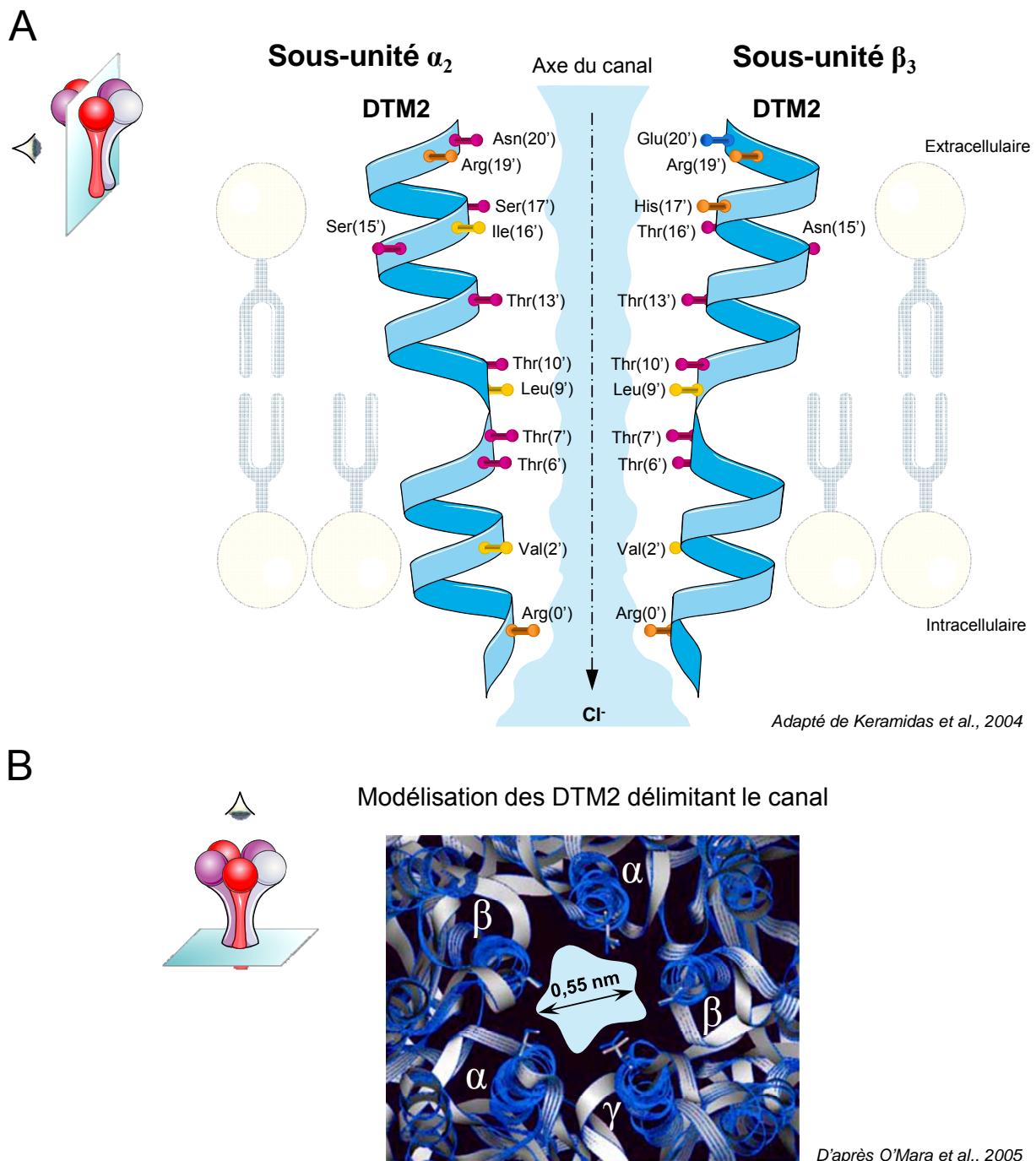


Figure 5 : Caractéristiques du canal chlore associé au récepteur GABA_A. A. Représentation schématique du canal chlore associé au récepteur GABA_A dans sa configuration ouverte, délimité à gauche par le DTM2 de la sous-unité α_2 et à droite par le DTM2 de la sous-unité β_3 (Adapté de Keramidas et al., 2004). Les acides aminés représentés sont ceux dont la chaîne latérale projette dans la lumière du canal, identifiés par les méthodes de substitution de résidus. La majorité d'entre eux sont des résidus polaires (rose). La sélectivité ionique du canal est déterminée par la présence à son extrémité distale (position 0', face cytosolique) d'un anneau de charges positives formé des 5 résidus Arg(0'). Un deuxième anneau est également retrouvé plus en amont du canal, formé des résidus Arg(19'). L'hélice α présente une distorsion au niveau du résidu Thr(7'), permettant ainsi à cet acide aminé d'être exposé à la lumière du canal. Résidus basiques (orange), résidus acides (bleu), résidus polaires (rose) et résidus apolaires (jaune). B. Modélisation des 5 DTM2 formant le canal chlore vue du dessus, obtenue par calcul des interactions électrostatiques et simulation informatique des mouvements Browniens (D'après O'Mara et al., 2005).

l’assemblage des différentes sous-unités du récepteur GABA_A (Sarto-Jackson et Sieghart, 2008). Dans le premier mécanisme, deux sous-unités α_1 mutées interagissent *via* le domaine exposé à lumière du canal, permettant à une sous-unité β_3 de s’associer d’un côté du dimère α_1 (Sarto-Jackson *et al.*, 2007). Cette formation conduirait à l’ouverture étroite du canal, permettant alors à une quatrième et une cinquième sous-unité de finaliser l’assemblage du récepteur. Dans l’autre mécanisme, l’assemblage du récepteur GABA_A commence avec la formation d’un hétérodimère de α_1 et β_3 (ou γ_2), par l’intermédiaire de leurs faces (+) et (-) respectives. De cette manière, chaque sous-unité additionnelle peut s’intercaler pour former une stoechiométrie et un arrangement corrects (Figure 4A) (Sarto-Jackson and Sieghart, 2008).

1.3. Topologie du canal chlore associé au récepteur GABA_A

Les premières données concernant l’organisation spatiale des récepteurs canaux proviennent des études réalisées sur les récepteurs nicotiniques. Il est maintenant bien établi que le DTM2 de chacune des 5 sous-unités de ces récepteurs constitue la paroi du canal ionique central (Unwin, 1993 ; Vafa and Schofield, 1998). La substitution de 3 acides aminés du DTM2 de la sous-unité α_7 du récepteur nicotinique par les acides aminés du DTM2 du récepteur GABA_A ou du récepteur de la glycine, commute la sélectivité aux cations Na⁺ en une sélectivité aux anions Cl⁻ (Galzi *et al.*, 1992). La mutation de résidus Thr et Ile en Cys par la méthode de substitution de résidus (*Substituted Cysteine Accessibility Method, SCAM*) dans la sous-unité α_1 a permis de révéler que certains acides aminés du DTM2 retrouvés à chaque tour de l’hélice α sont orientés vers l’intérieur du canal où ils forment un environnement polaire (Figure 5A). La mutation du neuvième résidu Leu (Leu 9') des DTM2 (α_1 Leu²⁶⁴, β_2 Leu²⁵⁹ et γ_2 Leu²⁵⁸) délimitant le canal altère ses propriétés de repos, et conduit à l’ouverture constitutive du pore (Figure 5A) (Chang *et al.*, 1996 ; Chang and Weiss, 1999 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Dalziel *et al.*, 2000 ; Bianchi and Macdonald, 2001). La sélectivité ionique du canal associé au récepteur GABA_A est déterminée par les résidus localisés à l’extrémité distale de la boucle i₁ reliant le DTM1 au DTM2, en particulier les résidus Ala et Arg situés en position -1 et 0, respectivement, et conservés entre le récepteur GABA_A et les récepteurs

Introduction

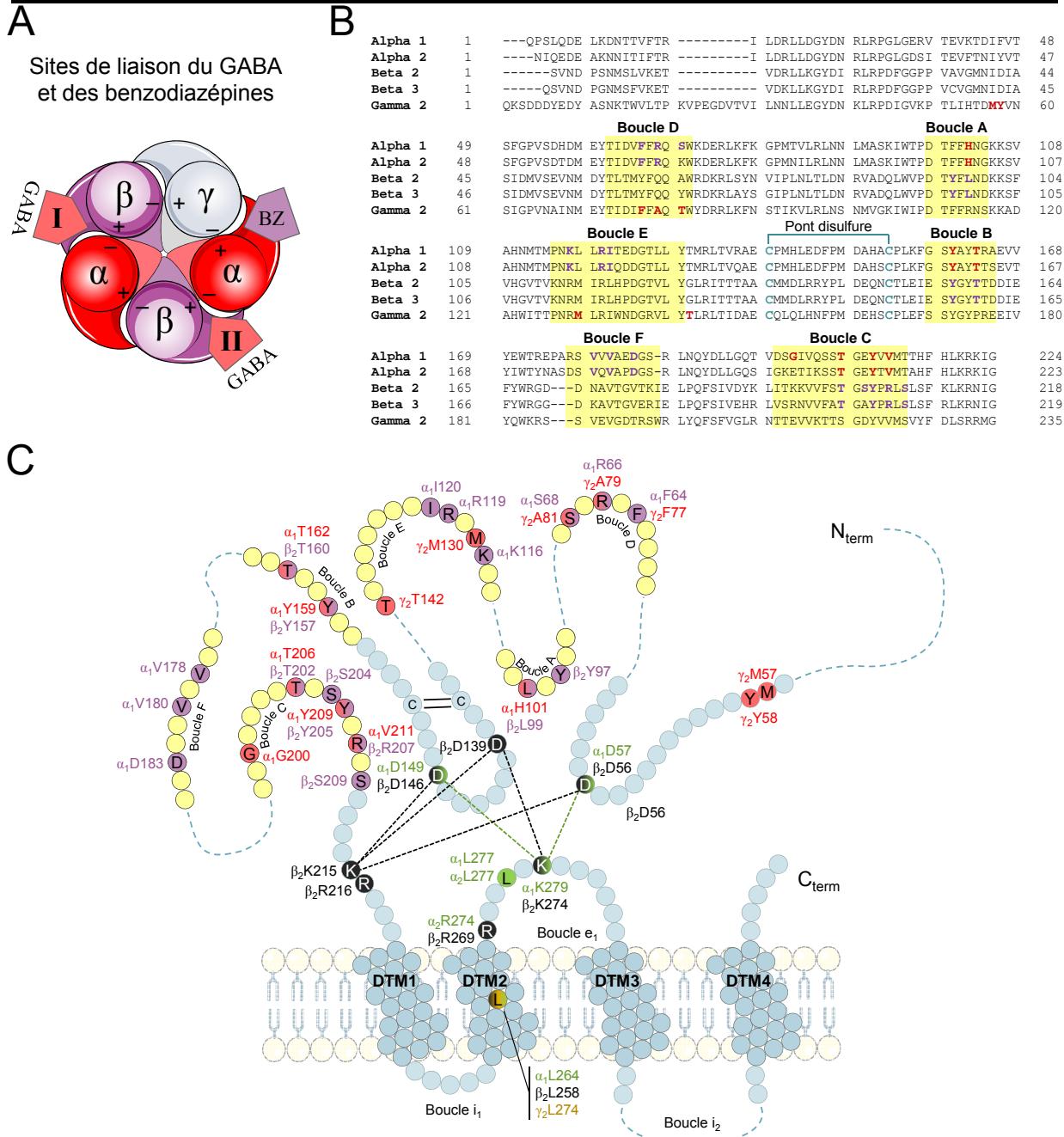


Figure 6 : Séquences des sous-unités α , β et/ou γ humaines impliquées dans la liaison de l'agoniste au récepteur. A. Représentation des sites de liaison de haute (II) et de basse (I) affinité pour le GABA, et du site de liaison des benzodiazépines (BZ). B. L'alignement des séquences de l'extrémité N_{term} des sous-unités α_1 , α_2 , β_2 , β_3 et γ_2 humaines extraites des bases de données du National Center for Biotechnology Information a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalX. Les résidus impliqués dans la liaison de l'agoniste sont localisés dans 6 domaines distincts (A, B, C, D, E et F), surlignés en jaune, identifiés à l'aide du logiciel MaxHom par homologie au récepteur nicotinique (<http://www.predictprotein.org/>). Certains résidus identifiés en violet participent directement à la liaison de l'agoniste, d'autres au maintien de l'intégrité structurale du site de liaison, et d'autres aux changements conformationnels induits par la liaison du ligand. Les résidus identifiés en rouge interviennent dans la liaison des BZ. C. Représentation des acides aminés de chaque sous-unité du pentamère impliqués dans la liaison de l'agoniste ou des BZ. Les résidus qui constituent les 6 domaines de liaison de l'agoniste ont été colorés en jaune ; les acides aminés intercalant ont été représentés par une ligne discontinue bleue. Les résidus identifiés pour leur rôle dans la liaison de l'agoniste sont indiqués en violet et ceux participant à la liaison des BZ sont en rouge (la position de chaque acide aminé et les sous-unités sont annotées). Les résidus impliqués dans la transduction du signal pour l'ouverture du canal sont surlignés en vert (sous-unité α), noir (β) et orange (γ). Les lignes discontinues vertes et noires correspondent respectivement aux interactions électrostatiques des sous-unités α et β .

glycinergiques (Jensen *et al.*, 2002, 2005 ; Keramidas *et al.*, 2004). Jensen *et al.* (2005) ont montré que la substitution des acides aminés de la boucle i_1 de β_3 , par les acides aminés homologues de la sous-unité α_7 du récepteur nicotinique, transforme le canal anionique associé au complexe $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ en canal cationique. L'analyse des perméabilités relatives de divers anions a permis d'évaluer le diamètre interne du canal à 0,55 nm dans son état d'ouverture maximal (Figure 5B) (Inomata *et al.*, 1986 ; Bormann *et al.*, 1987 ; Fatima-Shad and Barry, 1993 ; Kaila, 1994 ; Wotring *et al.*, 1999). Dans des conditions physiologiques normales, le chlore et le bicarbonate sont les deux seuls anions transportés à travers le canal, même si le courant induit par la fixation du GABA sur le récepteur GABA_A présente toutes les caractéristiques électrophysiologiques d'un courant transporté majoritairement par les ions chlore (Kaila, 1994).

1.3.1. Ouverture du canal

L'ouverture optimale du canal chlore est déclenchée par la fixation de deux molécules de GABA sur deux sites impliquant les interfaces (–) des sous-unités α et (+) des sous-unités β , mais présentant des propriétés différentes (Sakman *et al.*, 1983 ; Schofield *et al.*, 1987). En effet, le « site II » encadré par les sous-unités γ et α ($\gamma\alpha\beta\alpha$) est plus affin pour le GABA que le « site I », encadré par les sous-unités β et γ ($\beta\alpha\beta\gamma$) (Figure 6A) (Baumann *et al.*, 2003). D'autres ligands, comme l'agoniste muscimol et l'antagoniste bicuculline sont plus sélectifs du site I. Les résidus impliqués dans la liaison du GABA appartiennent à des domaines (boucles A-F par analogie avec le récepteur nicotinique) localisés sur les segments N_{term} extracellulaires des sous-unités α et β (Figure 6B) (Berezhnay *et al.*, 2007). Des expériences de mutagenèse dirigée (Sigel *et al.*, 1992 ; Amin and Weiss, 1993 ; Westh-Hansen *et al.*, 1997, 1999 ; Hartvig *et al.*, 2000), l'utilisation de ligands radiomarqués (Smith and Olsen, 1994), ou la méthode SCAM (Boileau *et al.*, 1999, 2002 ; Wagner and Czajkowski, 2001 ; Newell and Czajkowski, 2003) ont permis de démontrer une implication des acides aminés Phe⁶⁴, Arg⁶⁶ et Ser⁶⁸ (boucle D), Lys¹¹⁶, Arg¹¹⁹ et Ile¹²⁰ (boucle E), Val¹⁷⁸, Val¹⁸⁰ et Asp¹⁸³ (boucle F) de la sous-unité α_1 , et des acides aminés Tyr⁹⁷ et Leu⁹⁹ (boucle A), Tyr¹⁵⁷ et Thr¹⁶⁰

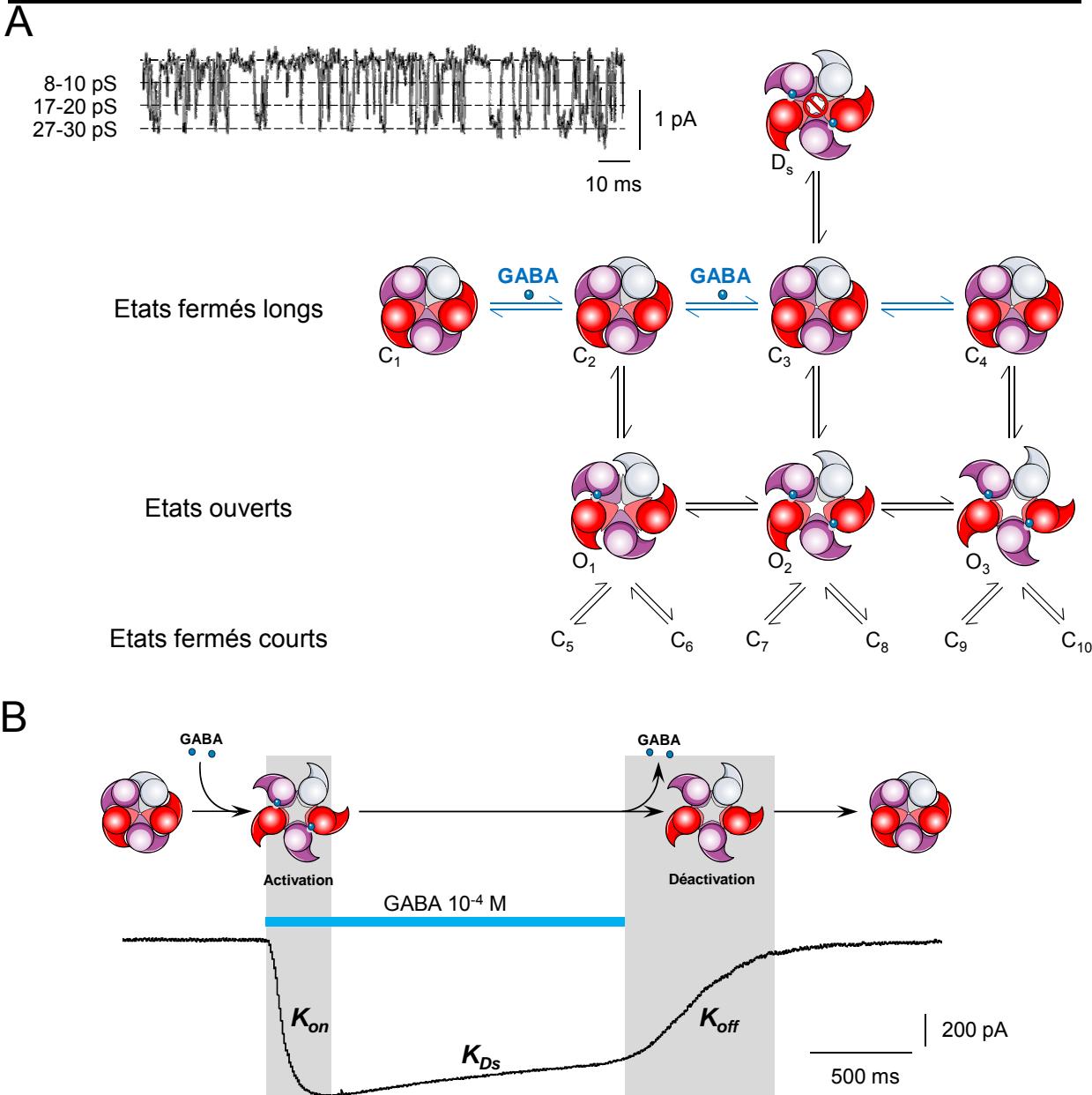


Figure 7 : Caractéristiques électrophysiologiques du récepteur GABA_A. A. Schéma réactionnel de la cinétique d'ouverture du canal chlore. La liaison de deux molécules de GABA sur deux sites distincts du récepteur GABA_A entraîne l'ouverture du canal chlore associé au récepteur selon un état de conductance principal de 27-30 pS et de deux états sous-conductants de 8-10 et 17-20 pS. Les lignes pointillées représentent les trois niveaux de conductance. L'état de conductance principal présente au moins trois états d'ouverture (O₁, O₂ et O₃) possédant des durées moyennes d'ouverture de 0,5, 2,5 et 7,3 ms. A faible concentration de GABA, une seule molécule se lie et provoque le niveau 1 d'ouverture. Lorsque la concentration de GABA augmente, une seconde molécule vient se lier au récepteur et augmente la fréquence d'apparition des états d'ouverture O₂ et O₃. Les états de fermeture C₁, C₂ et C₃ correspondent aux états non ligandé, mono-ligandé et bi-ligandé, respectivement. Les états d'ouverture O₁, O₂ et O₃ passent transitoirement par des états de fermeture de courte durée C_{5/6}, C_{7/8} et C_{9/10}. Les états O₁, O₂ et O₃ produisent des bouffées d'ouverture séparées par de longs états de fermeture (C₃₋₄). Dans le schéma proposé, l'état désensibilisé (D_s) se trouve placé à proximité de l'état C₃ de façon arbitraire, pour indiquer que les ouvertures de longue durée et les bouffées sont enregistrées en présence de concentrations désensibilisantes de GABA. **B.** Détail d'un enregistrement électrophysiologique d'un courant chlore généré par l'application de GABA (10⁻⁴ M) à proximité d'une cellule CHO exprimant les sous-unités humaines α₂, β₃ et γ₂ du récepteur GABA_A. La liaison de GABA entraîne l'ouverture du canal associé au récepteur, et évoque un courant chlore qui s'active rapidement (constante d'activation, K_{on}) et désensibilise en présence du ligand (constante de désensibilisation, K_{Ds}). Pendant le rinçage, la dissociation du ligand et la fermeture du canal représentent ce que l'on appelle la déactivation du canal chlore (constante de déactivation, K_{off}).

(boucle B), Thr²⁰², Ser²⁰⁴, Thr²⁰⁵, Arg²⁰⁷ et Ser²⁰⁹ (boucle C) de la sous-unité β_2 (Figure 6B et C).

La portion N_{term} extracellulaire de ces sous-unités est couplée « mécaniquement » à la région pré-DTM1, dans laquelle le feuillet β se prolonge par l'hélice α du DTM1, et pénètre la membrane. Ainsi, les études montrent que l'interaction du GABA induit des changements structurels à proximité du DTM1, dans le DTM2 et dans la boucle e₁ des sous-unités α et β (Figure 6C) (Xu and Akabas, 1996 ; O'Shea and Harrison, 2000 ; Horenstein *et al.*, 2001 ; Bera *et al.*, 2002 ; O'Shea *et al.*, 2009). Dans cette dernière, des résidus Lys participeraient au changement conformationnel *via* des interactions électrostatiques avec les domaines extracellulaires N_{term}, conduisant à une rotation des DTM2 et à l'ouverture du canal (Sigel *et al.*, 1999 ; O'Shea and Harrison, 2000 ; Kash *et al.*, 2003, 2004 ; Xiu *et al.*, 2005).

1.3.2. Caractéristiques électrophysiologiques du courant évoqué par le GABA

Les premières mesures de courants unitaires réalisées sur des cultures neuronales de Souris ont révélé que le canal chlore associé au récepteur GABA_A présente au moins une conductance unitaire se situant entre 20 et 30 pS (Mathers and Barker, 1981 ; Study and Barker, 1981). Par la suite, un état de conductance principal de 27-30 pS, responsable de 95% du courant évoqué par le GABA, et deux états sous-conductants de 8-10 et 17-20 pS, ont été caractérisés dans la plupart des types cellulaires étudiés (Figure 7A) (Hamill *et al.*, 1983 ; Bormann and Clapham, 1985 ; Macdonald and Twyman, 1992). Les études menées sur des récepteurs recombinants ont permis de montrer que les résidus polaires hydroxylés du DTM2 qui bordent le pore, conservés en position 6', 10' et 13', sont impliqués dans le fonctionnement du canal (Figure 5A). La présence d'une sous-unité γ au sein du complexe lui confère une conductance deux fois plus importante que ceux uniquement constitués des sous-unités α et β (Puia *et al.*, 1990 ; Verdoorn *et al.*, 1990 ; Angelotti and Macdonald, 1993 ; Fisher and Macdonald, 1997b ; Brickley *et al.*, 1999 ; Boileau *et al.*, 2005). En effet, la sous-unité γ présente un résidu polaire additionnel en position 2' qui maintiendrait l'ouverture du canal dans son état de conductance le plus élevé (Luu *et al.*, 2005).

La nature des sous-unités qui composent un récepteur-canal influence l'affinité (sensibilité du récepteur pour le GABA), l'activation (K_{on} , le délai entre la liaison du ligand et l'ouverture complète du canal), la déactivation (K_{off} , le délai entre la dissociation de l'agoniste et l'ouverture du canal) et la désensibilisation (K_{Ds} , la diminution de la capacité d'ouverture du canal pendant l'exposition à l'agoniste). Le schéma réactionnel correspondant à ces différents états est illustré dans la Figure 7. L'élaboration de courbes concentration-réponse au GABA sur des lignées exprimant des récepteurs recombinants formés par l'association de diverses sous-unités de classes différentes, a révélé que le GABA agit avec des affinités et des efficacités différentes en fonction du type de récepteur GABA_A (Ducic *et al.*, 1995). En particulier, des récepteurs formés d'une sous-unité δ présentent une meilleure affinité pour le GABA que des complexes $\alpha\beta$ ou $\alpha\beta\gamma$ (Fisher and Macdonald, 1997b ; Sundstrom-Poromaa *et al.*, 2002 ; Wallner *et al.*, 2003 ; Hanchar *et al.*, 2004). En revanche, des récepteurs composés d'une sous-unité γ_2 s'activent plus rapidement ($K_{on} = 0,46$ ms) et présentent une cinétique de déactivation plus lente ($K_{off} = 76,1$ ms) que des complexes de type $\alpha\beta$ ($K_{on} = 1,7$ ms ; $K_{off} = 34,1$ ms) ou $\alpha\beta\delta$ ($K_{on} = 2,4$ ms ; $K_{off} = 42,8$ ms) (Haas and Macdonald, 1999). De plus, la substitution d'une sous-unité α_1 par une sous-unité α_2 entraîne une activation deux fois plus rapide (90% de la réponse en 0,5 ms) de l'ouverture du canal et augmente de 6 à 7 fois la durée de déactivation (Lavoie *et al.*, 1997). En résumé, on estime qu'un récepteur GABA_A formé des sous-unités α , β et γ , présente 3 états d'ouverture, 10 états de fermeture et 1 état désensibilisé (Figure 7).

Ces caractéristiques de désensibilisation (3 constantes : rapide ≈ 10 ms, intermédiaire ≈ 150 ms et lente ≈ 1500 ms) et de déactivation déterminent deux types de transmission GABAergique, l'inhibition phasique et l'inhibition tonique. En effet, il a été observé que les récepteurs de type $\alpha\beta\gamma$ comprenant la sous-unité γ_2L , généralement situés au niveau des synapses, étaient caractérisés par une désensibilisation plus rapide accompagnée d'une déactivation prolongée (transmission tonique) alors que les complexes $\alpha\beta\delta$, qui ont plutôt une localisation extrasynaptique et périsinaptique (Nusser *et al.*, 1998 ; Haas and Macdonald, 1999 ; Wei *et al.*, 2003), désensibilisent plus lentement et présentent une constante de

déactivation faible (transmission phasique). Les études réalisées à partir de sous-unités chimériques et de mutagenèse dirigée suggèrent que la déactivation fait intervenir les séquences du DTM1, et notamment les résidus Val²³³ et Tyr²³⁴ de la sous-unité δ , et les résidus homologues Tyr²³⁵ et Phe²³⁶ de la sous-unité γ_2L (Martinez-Torres *et al.*, 2000 ; Bianchi *et al.*, 2001), ainsi que du DTM2, en particulier les résidus Leu²⁶⁴ ou Ser²⁷⁰ de α_1 et Thr²⁶⁶ de α_6 (Im *et al.*, 1995 ; Scheller and Forman, 2002).

1.4. Localisation des sous-unités

Des expériences d’hybridation *in situ* et d’immunohistochimie ont permis de montrer que l’expression des différentes sous-unités du récepteur GABA_A varie au cours du développement et que la composition en sous-unités diffère selon les aires cérébrales (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Wisden *et al.*, 1992 ; Fritschy and Mohler, 1995 ; Schwarzer *et al.*, 2001). Le Tableau 2 résume les principales distributions des complexes GABAergiques dans le SNC à l’âge adulte.

Les sous-unités α_2 , α_3 , α_4 et α_5 sont les sous-unités dont l’expression est majoritaire aux différents stades embryonnaires (E). La sous-unité α_3 est exprimée à partir de E14 au niveau cortical et thalamique. Les sous-unités α_2 et α_5 apparaissent à partir de E15 au niveau des zones germinatives corticales et hippocampiques, suivie de la sous-unité α_4 à partir de E17. Leurs niveaux d’expression augmentent à partir de E19 et se maintiennent chez l’adulte (Killisch *et al.*, 1991 ; Poulter *et al.*, 1992 ; Laurie *et al.*, 1992a, b ; Ma and Barker, 1995 ; Hutcheon *et al.*, 2004). L’expression de la sous-unité α_4 apparaît dans la période postnatale et présente un pic centré sur la deuxième semaine de vie (Laurie *et al.*, 1992a, b). La sous-unité α_1 est exprimée essentiellement aux stades néonatals (à partir de E19 dans le cortex) et son

Tableau 2 : Distribution des sous-unités du récepteur GABA_A dans le cerveau de Rat adulte. Ce tableau a été réalisé à partir de données obtenues par hybridation *in-situ* (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Persohn *et al.*, 1992 ; Wisden *et al.*, 1992 ; Bonnert *et al.*, 1999 ; Sinkkonen *et al.*, 2000 ; Fujimura *et al.*, 2005 ; Sotiriou *et al.*, 2005), Northern blot (Hedblom and Kirkness, 1997), PCR quantitative (Fujimura *et al.*, 2005) et immunohistochimie (Fritschy and Möhler, 1995 ; Moragues *et al.*, 2000 ; Pirker *et al.*, 2000 ; Schwarzer *et al.*, 2001 ; Moragues *et al.*, 2002 ; Hutcheon *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2004 ; Sotiriou *et al.*, 2005). L’intensité des niveaux d’expression est représentée par le signe « + » : très forte expression (+++), forte (++) et faible (+). Les sous-unités ρ n’ont pas été introduites dans le tableau en raison de leur expression restreinte.

Introduction

Régions du cerveau de Rat adulte		Sous-unités du récepteur GABA _A														
		α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6	β_1	β_2	β_3	γ_1	γ_2	γ_3	δ	ϵ	θ
Aire Olfactive																
Couche plexiforme externe du bulbe olfactif		++	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Couche glomérale		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Couche granulaire interne																
Tubercule olfactif		++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Ilots de Calleja		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Cortex olfactif primaire		++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Cortex Cérébral																
Couches 1 à 4		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Couches 5 à 6		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Cortex cingulaire antérieur		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Région Limbique, Hippocampe, Amygdale																
Cortex entorhinal																
Subiculum																
Hippocampe, CA1																
Hippocampe, CA3																
Hippocampe, Gyrus Dentelé																
Noyau du lit de la strie terminale, médian																
Noyau de la branche horizontale de la bandette diagonale																
Noyau septo-hippocampal (<i>Taenia tecta</i>)																
Noyau du septum latéral																
Noyau du septum triangulaire																
Noyau du lit de la commissure antérieure																
Aire amygdalienne antérieure																
Amygdale																
Noyaux corticaux amygdaliens postérieur et médian																
Ganglions de la base/Striatum																
Noyau accumbens																
Noyau caudé/Putamen																
Globus pallidus																
Clastrum																
Pallidum, ventral/Substantia innominata																

Régions du cerveau de Rat adulte		Sous-unités du récepteur GABA _A														
		a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	β_1	β_2	β_3	γ_1	γ_2	γ_3	δ	ϵ	θ
Thalamus, Epithalamus																
Noyau thalamique paraventriculaire																
Noyau thalamique antérodorsal																
Noyaux thalamiques centrolatéral et centromédian																
Noyau thalamique médiodorsal																
Noyaux thalamiques latéral postérieur et latéro-dorsal																
Noyau thalamique ventral postérieur																
<i>Zona incerta</i> /Noyau subthalamique																
Noyau habenulaire médial																
Noyau géniculé médial																
Hypothalamus																
Noyaux préoptiques médian et péiventriculaire																
Noyau préoptique latéral																
Aire hypothalamique latérale																
Aire hypothalamique antérieure																
Noyau hypothalamique paraventriculaire																
Noyau hypothalamique ventromédian																
Mésencéphale, Pons, Medulla																
Substance noire, Pars reticulata																
Substance noire, Pars compacta																
Aire tegmentaire ventrale																
Noyau interpédonculaire																
Noyau rouge																
Colliculus supérieur, couche grise supérieure																
Colliculus supérieur, couche grise intermédiaire																
Noyau gris central																
Colliculus inférieur																
Noyau du raphé																
Locus cœruleus																
Cervelet																
Couche granulaire																
Couche moléculaire																

niveau d'expression augmente au cours du développement pour devenir très intense chez l'adulte dans un grand nombre de structures cérébrales (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Poulter *et al.*, 1992). La sous-unité α_6 a essentiellement une expression postnatale tardive (P6) et restreinte au cervelet et au noyau cochléaire (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Drescher *et al.*, 1993 ; Varecka *et al.*, 1994), même si de très faibles niveaux sont détectables aux stades embryonnaires dans plusieurs structures (Poulter *et al.*, 1992).

La sous-unité β_1 est exprimée au niveau de la zone ventriculaire corticale à partir de E17 (Ma and Barker, 1995 ; Laurie *et al.*, 1992a, b). Les sous-unités β_2 et β_3 sont également présentes dès le stade E17 au niveau du cortex, de l'hippocampe (où β_2 n'est exprimée qu'à partir de la naissance) et du cervelet (où β_2 n'est exprimée qu'à la fin de la deuxième semaine de vie postnatale) (Laurie *et al.*, 1992a, b).

La sous-unité γ_1 est exprimée à partir de E17 au niveau de la zone ventriculaire corticale (Ma and Barker, 1995). Son expression reste ensuite modérée jusqu'à l'âge adulte disparaissant même au niveau hippocampique (Laurie *et al.*, 1992a, b). La sous-unité γ_2 est exprimée à partir de E17 et son expression s'intensifie à l'âge adulte dans la majorité des structures cérébrales (Laurie *et al.*, 1992a, b). La sous-unité γ_3 possède quant à elle une expression postnatale transitoire, avec un pic d'expression au cours de la deuxième semaine de vie pour disparaître chez l'adulte (Laurie *et al.*, 1992a, b).

La sous-unité δ est exprimée essentiellement après la naissance, et son expression augmente au cours du développement postnatal jusqu'à l'âge adulte au niveau du cervelet, du thalamus, du striatum et des cellules en grain du gyrus dentelé (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Wisden *et al.*, 1992 ; Fritschy and Möller, 1995 ; Sperk *et al.*, 1997 ; Pirker *et al.*, 2000 ; Peng *et al.*, 2002). Son profil d'expression présente de nombreuses similitudes à celui des sous-unité α_6 et α_4 (Laurie *et al.*, 1992a, b ; Wisden *et al.*, 1992).

Les sous-unités ε et θ présentent une distribution limitée au locus cœruleus, au raphé dorsal et aux neurones cholinergiques (Whiting *et al.*, 1997 ; Sinkkonen *et al.*, 2000 ; Moragues *et al.*, 2002), alors que la sous-unité π est principalement détectée dans le système périphérique, au niveau de l'utérus (Hedblom and Kirkness, 1997 ; Zafrakas *et al.*, 2006).

Enfin, les sous-unités ρ sont majoritairement détectées au niveau de la rétine (Wegelius *et al.*, 1998).

2. Modulation de la fonction du récepteur GABA_A

2.1. Régulation allostérique par les ligands extracellulaires

Parmi les récepteurs-canaux, le récepteur GABA_A est certainement celui qui comporte le plus grand nombre de sites effecteurs pour des composés endogènes ou exogènes, qui exercent une modulation allostérique de la réponse au GABA. Les modulateurs les plus connus, tels que les BZ, les barbituriques, les anesthésiques ou les stéroïdes, peuvent en effet interagir avec des sites de liaison distincts de ceux du GABA, et modifier ainsi l'activité du récepteur. L'ensemble des effets de ces modulateurs est résumé dans le Tableau 3.

2.1.1. Les benzodiazépines

La grande majorité des BZ se comportent comme des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A. Leur fixation sur le complexe pentamérique entraîne un changement conformationnel du site de fixation du GABA qui a pour conséquence d'augmenter l'affinité du récepteur pour le GABA ainsi que la fréquence d'ouverture ou la conductance unitaire du canal chlore (Rogers *et al.*, 1994 ; Eghbali *et al.*, 1997 ; Williams and Akabas, 2001). En raison de leur action potentialisatrice de la réponse au GABA, les BZ exercent des effets anxiolytiques, anticonvulsivants, sédatifs, hypnotiques, amnésiants ou myorelaxants (Rowlett *et al.*, 2005). A l'inverse, les β -carbolines (β -CCE et DMCM), lient le site des BZ et atténuent les effets du GABA. Ces molécules sont appelées « agonistes inverses » et ont un rôle anxiogène et proconvulsivant (Cowen *et al.*, 1981 ; Ninan *et al.*, 1982 ; Rogers *et al.*, 1994). L'action des BZ ou des β -carbolines peut être bloquée par des antagonistes du site sur le récepteur GABA_A, dont le flumazénil ou Ro 15-1788 (Hunkeler *et al.*, 1981), de fait utilisés en clinique en cas d'intoxication aux BZ.

Le site de liaison des BZ, distinct de celui du GABA, se situe à l'interface des sous-unités α et γ (Sigel, 2002 ; Ernst *et al.*, 2003 ; Ogris *et al.*, 2004 ; Goetz *et al.*, 2007). La nature des

sous-unités α et γ détermine ainsi l'affinité et le profil pharmacologique du récepteur GABA_A pour les BZ, alors que la nature de la sous-unité β n'interfère pas (Figure 8). La présence de l'isoforme γ_2 , retrouvée dans plus de 75% des récepteurs GABA_A exprimés au sein du SNC, est indispensable à la formation d'un complexe pentamérique de haute affinité pour les BZ (Mihic *et al.*, 1994b ; Sieghart, 1995 ; Hevers and Lüddens, 1998 ; Khom *et al.*, 2006). La sous-unité α , quant à elle, détermine le profil pharmacologique du site récepteur des BZ (Pritchett *et al.*, 1989 ; Buhr *et al.*, 1996 ; Amin *et al.*, 1997 ; Riss *et al.*, 2008). En effet, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que l'His¹⁰¹ sur la sous-unité α_1 est déterminante pour la liaison des BZ (Wieland *et al.*, 1992 ; Davies *et al.*, 1996 ; Dunn *et al.*, 1999 ; Wingrove *et al.*, 2002). Ce résidu histidine est aussi conservé au niveau des sous-unités

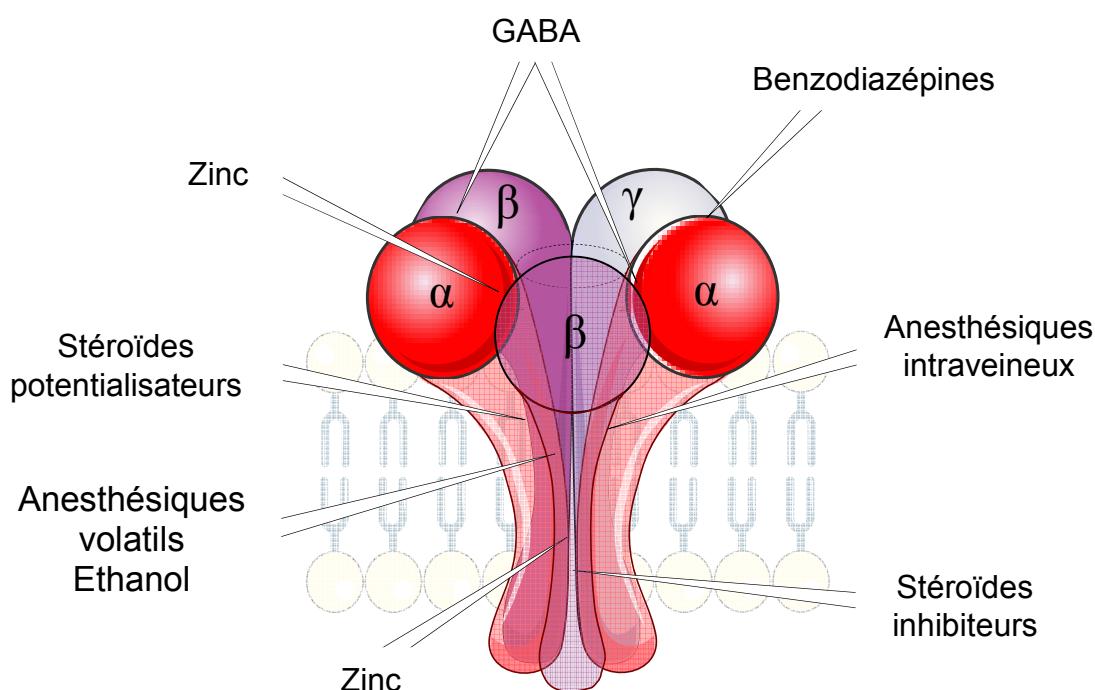


Figure 8 : Représentation schématique du site de fixation des modulateurs allostériques du récepteur GABA_A. Le récepteur GABA_A possède de nombreux sites de modulation allostérique topographiquement distincts. Le site de liaison du GABA se situe à l'interface des sous-unités α et β au niveau de leur domaine N_{term}. Deux molécules de GABA peuvent ainsi se fixer sur un récepteur de stœchiométrie 2 α 2 β 1 γ . Les benzodiazépines se fixent à l'interface des sous-unités α et γ . La liaison de l'éthanol et des anesthésiques volatils implique des résidus appartenant aux sous-unités α et β , la fixation des anesthésiques intraveineux mettant en jeu uniquement ces mêmes résidus de la sous-unité β . Les stéroïdes et le zinc possèdent chacun deux sites d'interaction avec le récepteur GABA_A. Pour le zinc, l'un est situé à l'interface des sous-unités α et β au niveau de leur domaine N_{term}, l'autre situé dans le canal impliquant deux résidus de la sous-unité β . Dans le cas des stéroïdes, des résidus des DTM1 et 4 de la sous-unité α constituent le premier site et des résidus des sous-unités α et β forment un second site.

α_2 , α_3 et α_5 mais est substitué par une arginine sur les sous-unités α_4 et α_6 . En conséquence, ces deux sous-unités présentent une affinité diminuée, voire une insensibilité à certaines BZ telles que le diazépam (Valium®, Roche Pharmaceuticals) (Lüddens *et al.*, 1990 ; Knoflach *et al.*, 1996 ; Korpi *et al.*, 2002 ; Harrison, 2007). Ainsi, sur la base de ces critères pharmacologiques, mais aussi biochimiques et structuraux, les sites récepteurs des BZ ont été classés en considérant leur sensibilité ou non au diazépam (Malminniemi and Korpi, 1989 ; Hadingham *et al.*, 1996 ; Knoflach *et al.*, 1996). Parmi les récepteurs GABA_A sensibles à cette BZ, on distingue les récepteurs de haute affinité de type I (BZI), comprenant la sous-unité α_1 (Sieghart, 1995 ; Smith, 2001), majoritairement retrouvés au sein du SNC et impliqués dans les effets sédatifs et anticonvulsivants des BZ (Tableau 3) (Kralic *et al.*, 2002). Les sites de plus faible affinité, de type II (BZII), associent les isoformes α_2 , α_3 et α_5 au sein des pentamères exprimés en particulier dans l'hippocampe, le striatum, la moelle épinière ou le cortex néonatal, et dont l'activation est à l'origine des propriétés myorelaxantes et anxiolytiques des BZ (Pritchett *et al.*, 1989 ; Rabow *et al.*, 1995 ; Orser, 2006). Ainsi, à ce jour, les BZ sont devenus les principaux agents pharmacologiques utilisés pour le traitement de l'anxiété, de l'épilepsie, des maladies du sommeil, pour le sevrage de l'alcool ainsi qu'en anesthésie (Haefely *et al.*, 1992 ; Shader and Greenblatt, 1993 ; Mohler *et al.*, 1996 ; Yamawaki, 1999 ; Allgulander *et al.*, 2003 ; Nemeroff, 2003 ; Jones-Davis and Macdonald, 2003 ; Henschel *et al.*, 2008).

2.1.2. Les anesthésiques

La plupart des anesthésiques (intraveineux et volatils) renforcent l'action du GABA sur le récepteur GABA_A, ce qui entraîne une augmentation de la conductance chlore et une inhibition de la propagation des potentiels d'action (Figure 8) (Campagna *et al.*, 2003 ; Rudolph and Antkowiak 2004 ; Snead and Gibson 2005). Il existe deux classes d'anesthésiques, *i.e.* les anesthésiques volatils tels que l'isoflurane, l'halothane ou l'enflurane (Moody *et al.*, 1988 ; Lin *et al.*, 1992 ; Harrison *et al.*, 1993 ; Hall *et al.*, 1994 ; Mihic *et al.*, 1994a ; Harris *et al.*, 1995), et les anesthésiques intraveineux comme le propofol, le pentobarbital (famille des

	Effets associés	Sous-unité(s) impliquée(s)	Références
Benzodiazépines			
<i>Agonistes</i>			
Diazepam, Flunitrazepam, Clonazepam, Lorazepam	Sédatif Anticonvulsivant Amnésiant Myorelaxant Anxiolytique	α_1 α_1 (en partie) α_1 et α_5 α_2 α_2 et α_3	6, 40, 43, 52, 53
DMCM	ND	γ_1	31, 68
Flumazenil	ND	α_4 , γ_1	31, 33, 68
<i>Agonistes partiel</i>			
Bretazenil	Anxiolytique >> Sédatif	$\alpha_1 >> \alpha_{2,3,5}$	4, 5, 19, 32, 42
Zolpidem	Hypnotique >> Amnésique	$\alpha_1 >> \alpha_{2,3}$	37, 54, 55, 56
<i>Agonistes inverses</i>			
DMCM	Proconvulsivant, Anxiogène, Promnésiant	$\alpha_{1,3,4,5}$	5, 13, 14, 15, 18, 58, 65, 71
β -CCE	Insomnie, Proconvulsivant	$\alpha_{1,3,4,5}$	7, 15, 38, 67
<i>Antagonistes</i>			
Flumazenil	Anti-sédatif, Sevrage de l'alcool et des benzodiazépines	$\alpha_{1,2,3,5} >> \alpha_{4,6}$	10, 16, 24, 41, 47, 50
Stéroïdes			
<i>Stéroïdes potentialisateurs</i>			
3 α ,5 α -THPROG, 3 α ,5 β -THPROG, 3 α ,5 α -THDOC	Anesthésique, Sédatif, Anticonvulsivant, Anxiolytique	α_1 , $\beta_{2,3}$ et δ	1, 26, 27, 28, 49, 72, 73, 76
<i>Stéroïdes inhibiteurs</i>			
Prénisolone sulfate DHEA sulfate	Anxiogène et Proconvulsivant	$\alpha\beta\gamma >> \alpha\beta\delta$	3, 34, 49, 63, 73, 77
Anesthésiques intraveineux			
<i>Potentialisateurs</i>			
Propofol, Etomidate, Pentobarbital	Immobilisant, Hypnotique Dépression respiratoire Sédatif	β_3 β_2	8, 12, 22, 23, 30, 46, 51, 57, 74
Anesthésiques volatils			
<i>Potentialisateurs</i>			
Isoflurane, Halothane, Enflurane	Immobilisant, Sédatif Dépression respiratoire,	α_1 , β_2 et β_3 (en partie)	9, 30, 36, 39, 75
Alcools			
<i>Potentialisateurs</i>			
Ethanol	Anesthésique, Sédatif Anxiolytique	α_6 , α_4 , β_3 , δ	2, 20, 21, 35, 48, 69, 70
Ions			
<i>Antagonistes</i>			
Zn ²⁺	ND	α_6 , β_3 et $\delta > \alpha_1$, β_1 et γ	11, 17, 25, 33, 59, 60, 64
<i>Potentialisateurs</i>			
La ³⁺	ND	α_1 , α_6 et γ	29, 45, 61
Mg ²⁺	ND	α et β	44, 62, 66

barbituriques) ou l'étomidate (Concas *et al.*, 1990 ; Hara *et al.*, 1994 ; Harris *et al.*, 1995 ; Irifune *et al.*, 2000). Les caractéristiques du pouvoir anesthésiant de ces agents sont liées à la dose à laquelle ils exercent leurs principales actions : l'hypnose, l'amnésie, la perte de conscience, la sédation ou l'immobilité (Moody *et al.*, 1988 ; Mihic *et al.*, 1994a ; Zimmerman *et al.*, 1994 ; Sonner *et al.*, 2003). A faible concentration, l'halothane, l'isoflurane, et le propofol potentialisent la réponse au GABA en diminuant la vitesse de dissociation du GABA de son récepteur, et donc en prolongeant la déactivation (Bai *et al.*, 1999 ; Li and Pearce, 2000 ; Borghese *et al.*, 2006a). Dans le cas du propofol, la cinétique de désensibilisation du canal est de plus ralentie (Bai *et al.*, 1999). En revanche, les barbituriques tels que le pentobarbital et phenobarbital favorisent la fonction GABAergique en augmentant la durée d'ouverture du canal chlore (Study and Barker, 1981 ; Belelli *et al.*, 1999 ; Rudolph and Antkowiak, 2004). Pour de plus fortes concentrations, comprises entre 100 et 300 µM pour les anesthésiques volatils ou le propofol, et entre 50 µM et 1 mM pour les barbituriques, les anesthésiques et les barbituriques se comportent comme des GABA-mimétiques et sont

⇒ **Tableau 3 : Modulateurs allostériques principaux de la fonction GABAergique.** Les effets des différents modulateurs allostériques, *i.e.* les benzodiazépines, les stéroïdes, les anesthésiques, l'alcool ou les ions du récepteur GABA_A sont mentionnés en italique. Les effets physiologiques induits peuvent être associés à certains types de combinaisons en sous-unités. La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Adkins *et al.*, 2001 ; **2**, Aguayo *et al.*, 2002 ; **3**, Akk *et al.*, 2001 ; **4**, Atack, 2005 ; **5**, Atack, 2003 ; **6**, Atack *et al.*, 2006 ; **7**, Auta *et al.*, 1997 ; **8**, Belelli *et al.*, 1997 ; **9**, Borghese *et al.*, 2006a ; **10**, Buck *et al.*, 1991 ; **11**, Burgard *et al.*, 1996 ; **12**, Cestari *et al.*, 2000 ; **13**, Crestani *et al.*, 2002 ; **14**, Dawson *et al.*, 2006 ; **15**, Derry *et al.*, 2004 ; **16**, Doble, 1999 ; **17**, Draguhn *et al.*, 1990 ; **18**, Gardner *et al.*, 1993 ; **19**, Haefely *et al.*, 1992 ; **20**, Hanchar *et al.*, 2004 ; **21**, Hanchar *et al.*, 2006 ; **22**, Hentschke *et al.*, 2005 ; **23**, Hill-Venning *et al.*, 1997 ; **24**, Hoffman and Warren, 1993 ; **25**, Hosie *et al.*, 2003 ; **26**, Hosie *et al.*, 2006 ; **27**, Hosie *et al.*, 2007 ; **28**, Hosie *et al.*, 2009 ; **29**, Im *et al.*, 1992 ; **30**, Jurd *et al.*, 2003 ; **31**, Khom *et al.*, 2005 ; **32**, Knoflach *et al.*, 1993 ; **33**, Knoflach *et al.*, 1996 ; **34**, Korpi and Sinkkonen, 2006 ; **35**, Korpi *et al.*, 1998 ; **36**, Lambert *et al.*, 2005 ; **37**, Langer *et al.*, 1992 ; **38**, Leonard *et al.*, 2009 ; **39**, Liao *et al.*, 2005 ; **40**, Low *et al.*, 2000 ; **41**, Malizia and Nutt 1995 ; **42**, Martin *et al.*, 1988 ; **43**, McKernan *et al.*, 2000 ; **44**, Möykkynen *et al.*, 2001 ; **45**, Narahashi *et al.*, 1994 ; **46**, O'Meara *et al.*, 2004 ; **47**, Olkkola and Ahonen, 2008 ; **48**, Olsen *et al.*, 2007 ; **49**, Park-Chung *et al.*, 1999 ; **50**, Potokar *et al.*, 1997 ; **51**, Reynolds *et al.*, 2003 ; **52**, Rudolph and Mohler, 2006 ; **53**, Rudolph *et al.*, 1999 ; **54**, Sancar *et al.*, 2006 ; **55**, Sanger *et al.*, 1996 ; **56**, Sanger *et al.*, 1999 ; **57**, Sanna *et al.*, 1997 ; **58**, Savic *et al.*, 2006 ; **59**, Saxena and MacDonald, 1994 ; **60**, Saxena and MacDonald, 1996 ; **61**, Saxena *et al.*, 1997 ; **62**, Schwartz *et al.*, 1994 ; **63**, Shen *et al.*, 2000 ; **64**, Smart *et al.*, 1991 ; **65**, Sternfeld *et al.*, 2004 ; **66**, Usui-Oukari *et al.*, 2001 ; **67**, Venault *et al.*, 1986 ; **68**, Wafford *et al.*, 1993 ; **69**, Wallner *et al.*, 2003 ; **70**, Wallner *et al.*, 2006 ; **71**, Wieland *et al.*, 1992 ; **72**, Wohlfarth *et al.*, 2002 ; **73**, Zaman *et al.*, 1992 ; **74**, Zeller *et al.*, 2007 ; **75**, Zeller *et al.*, 2008 ; **76**, Zheleznova *et al.*, 2008 ; **77**, Zhu *et al.*, 1996. DHEA, Déhydro-épiandrostérone ; ND, non déterminé.

capables d'ouvrir le canal chlore en absence de GABA (Sanna *et al.*, 1996 ; Akk and Steinbach, 2000 ; Li *et al.*, 2000 ; Rudolph and Antkowiak, 2004 ; Henschel *et al.*, 2008). A des concentrations encore plus élevées (1 à 3 mM), les anesthésiques volatils et intraveineux accélèrent la désensibilisation du canal et bloquent les courants évoqués par le GABA *via* un site intra-pore (Figure 8) (Rho *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 1996).

Des données obtenues à partir de travaux basés sur *i)* des études électrophysiologiques de récepteurs recombinants constitués des sous-unités α et β ou β uniquement, *ii)* la mutation de certains acides aminés cibles des sous-unités du récepteur GABA_A (Mihic *et al.*, 1997 ; Belelli *et al.*, 1997 ; Krasowski *et al.*, 1998), *iii)* l'utilisation de souris knock-out pour le gène codant la sous-unité β_3 (Quinlan *et al.*, 1998 ; Mihalek *et al.*, 1999 ; Rudolph and Mohler, 2004), ou *iv)* l'utilisation de souris knock-in des sous-unités $\beta_{2/3}$ mutées en position Asp²⁶⁵ (Jurd *et al.*, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2003), ont permis de démontrer que les sous-unités α et β sont indispensables aux effets des anesthésiques volatils, alors que la sous-unité β est suffisante pour relayer les effets du pentobarbital, de l'étomide et du propofol (Zeller *et al.*, 2008). Il a été montré que les complexes GABAergiques contenant la sous-unité β_3 relaient entièrement les effets immobilisants de l'étomide et du propofol, et en partie des anesthésiques volatils (Jurd *et al.*, 2003 ; Lambert *et al.*, 2005 ; Liao *et al.*, 2005). De plus, les récepteurs formés des sous-unités β_1 et θ ($\alpha_3\beta_1\theta$) présentent une meilleure efficacité pour l'étomide que les complexes $\alpha_3\beta_1\gamma_2$ par exemple (Ranna *et al.*, 2006), alors que les complexes recombinants dans lesquels la sous-unité ϵ remplace γ_2 seraient insensibles aux anesthésiques généraux (Davies *et al.*, 1997a). Même si le site de liaison de ces composés n'est à ce jour pas encore bien caractérisé – les anesthésiques pouvant en effet s'insérer de manière non spécifique dans les membranes lipidiques (Franks and Lieb, 1997) – le rôle de certains acides aminés localisés dans les DTM a pu être mis en évidence. Ainsi, la mutation du résidu Gly²²³ du DTM1 de la sous-unité α_1 , ou la substitution de la Leu²³² de la sous-unité α_2 par une Phe, réduit les effets du pentobarbital et du propofol ou de l'halothane, respectivement (Jenkins *et al.*, 2001 ; Engblom *et al.*, 2002). La Ser²⁷⁰ et l'Ala²⁹¹ des DTM2 et DTM3, et les Tyr⁴¹¹, Tyr⁴¹⁵ et Leu⁴¹⁶ de DTM4 de la sous-unité α_1 sont également

impliquées dans les effets de l’isoflurane, de l’halothane et du propofol, et pourraient, avec la Leu²³² de DTM1, constituer une poche de liaison de ces agents (Mihic *et al.*, 1997 ; Krasowski *et al.*, 1997 ; Koltchine *et al.*, 1999 ; Jenkins *et al.*, 2001, 2002 ; Nishikawa *et al.*, 2002 ; Nishikawa and Harrison, 2003). Des résidus homologues, la Gly²¹⁹, l’Asn²⁶⁵ et la Met²⁸⁶, ont été identifiés sur les sous-unités β_2 et β_3 (Carlson *et al.*, 2000 ; Krasowski and Harrison, 2000 ; Krasowski *et al.*, 2001 ; Siegwart *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 2003 ; Nishikawa and Harrison, 2003 ; Bali and Akabas, 2004).

2.1.3. Les neurostéroïdes

Les stéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol dans les cellules de la corticosurrénale (glucocorticostéroïdes et minéralocorticoïdes), dans les gonades ainsi que dans le placenta (œstrogènes et androgènes, stéroïdes progestatifs). Corpéchot *et al.* (1981) ont été les premiers à mettre en évidence la production *de novo* de stéroïdes à partir du cholestérol dans le cerveau. La confirmation de la fonction stéroïdogène du cerveau a été apportée avec la caractérisation de la présence de la P450_{SCC}, l’enzyme clé assurant la conversion du cholestérol en prégnénolone (précurseur commun de toutes les hormones stéroïdiennes), dans les principaux types cellulaires du système nerveux, *i.e.* astrocytes, oligodendrocytes, cellules de Schwann et neurones (Le Goascogne *et al.*, 1987 ; Schumacher *et al.*, 1999 ; Zwain and Yen, 1999). Ainsi, les métabolites des stéroïdes, progestérone et androstérone, synthétisés dans le cerveau sont appelés neurostéroïdes (Lambert *et al.*, 1995) alors que ceux d’origine périphérique ou centrale, et modulant allostériquement l’activité de récepteurs de neurotransmetteurs, et notamment le récepteur GABA_A, sont appelés stéroïdes « neuroactifs » (Maitra and Reynolds, 1998).

Harrison et Simmonds (1984) furent les premiers à démontrer que l’action anesthésiante d’un stéroïde synthétique, l’alphaxalone (5α -prégnyne- 3α -ol-11,20-dione), était imputable à son effet potentialisateur sur la réponse au GABA (Harrison and Simmonds, 1984). Les neurostéroïdes endogènes incluant la prégnénolone, les métabolites de la progestérone 5α -prégnyne- 3α -ol-20-one ($3\alpha,5\alpha$ -THPROG) et 5β -prégnyne- 3α -ol-20-one ($3\alpha,5\beta$ -THPROG),

et le métabolite de la déoxycorticostérone 5α - prégnane- $3\alpha,21$ -diol-20-one ($3\alpha,5\alpha$ -THDOC) sont des modulateurs allostériques positifs de la fonction GABAergique (Tableau 3) (Belelli *et al.*, 1990 ; Lambert *et al.*, 1995). En effet, ces stéroïdes neuroactifs favorisent la liaison du flunitrazépam sur le site des BZ (Slany *et al.*, 1995), potentialisent l'amplitude du flux d'ions chlore induit par le muscimol (Morrow *et al.*, 1990), diminuent la liaison du bloqueur TBPS dans le canal (Davies *et al.*, 1997b) et augmentent le courant activé par le GABA dans des préparations neuronales et sur des cellules HEK293 exprimant des récepteurs recombinants (Shingai *et al.*, 1991 ; Davies *et al.*, 1997b). L'effet potentialisateur de ces agents sur le courant chlore est relayé par une augmentation de la fréquence et de la durée d'ouverture du canal (Puia *et al.*, 1990 ; Twyman and Macdonald, 1992 ; Akk and Steinbach, 2003 ; Bianchi and Macdonald, 2003 ; Reddy, 2003). De plus, pour des concentrations supérieures à $1 \mu\text{M}$, non physiologiques, ces neurostéroïdes, comme les anesthésiques, sont directement capables d'ouvrir le canal chlore en l'absence de GABA (Callachan *et al.*, 1987 ; Henschel *et al.*, 2008). L'ensemble de ces effets rendent compte des propriétés anesthésique, hypnotique, anticonvulsivante, et anxiolytique de ces stéroïdes (Belelli *et al.*, 1989 ; Bitran *et al.*, 1991 ; Britton *et al.*, 1991 ; Wieland *et al.*, 1991 ; Bitran *et al.*, 1995 ; Wieland *et al.*, 1995 ; Brot *et al.*, 1997 ; Belelli and Lambert, 2005 ; Farrant and Nusser, 2005). Cependant, d'autres stéroïdes exercent un effet inhibiteur sur la fonction GABAergique, tels que les stéroïdes-sulfate, *i.e.* la prégnénolone sulfate ou la déhydroépandrostéron (DHEA) sulfate. Ces effets sont dus à l'inhibition de la liaison d'agonistes du récepteur GABA_A (Gee *et al.*, 1989 ; Demirgören *et al.*, 1991), et/ou l'augmentation-stabilisation de la désensibilisation du récepteur, induisant ainsi des effets anxiogène et proconvulsivant (Zhu and Vicini, 1997 ; Shen *et al.*, 2000 ; Reddy, 2003).

L'application concomitante de stéroïdes et de barbituriques induit des effets additifs voire synergiques sur l'affinité du récepteur pour le GABA et sur le flux d'ions chlore, suggérant que ces molécules agissent sur des sites distincts au niveau du récepteur GABA_A (Peters *et al.*, 1988 ; Turner *et al.*, 1989). La présence de sites de fixation spécifiques des stéroïdes est aussi suggérée par les actions sélectives de leurs énantiomères (Belelli and Lambert, 2005) et

par le développement récent d'un antagoniste stéroïdogène, le $3\alpha,5\alpha$ -17-phenylandrost-16-en-3-ol (17PA), qui ne possède pas d'effet propre et bloque spécifiquement la liaison des stéroïdes 5α -prégnane (Mennerick *et al.*, 2004). Les stéroïdes sont actifs sur la plupart des récepteurs GABA_A multimériques formés de sous-unités appartenant aux classes α , β et γ (Puia *et al.*, 1990 ; Shingai *et al.*, 1991 ; Zaman *et al.*, 1992 ; Puai *et al.*, 1993). Toutefois, certaines sous-unités semblent conférer une forte sensibilité aux neurostéroïdes comme la sous-unité δ (Belelli *et al.*, 2002 ; Wohlfarth *et al.*, 2002), une insensibilité aux prégnanes, notamment les sous-unités π ou ϵ (Hedblom and Kirkness, 1997 ; Davies *et al.*, 1997a ; Thompson *et al.*, 2002), ou une pharmacologie sélective vis-à-vis des stéroïdes neuroactifs telle que la sous-unité ρ (Morris *et al.*, 1999 ; Morris and Amin, 2004). Même si certaines études proposent une interaction des stéroïdes avec la membrane qui se répercute sur la fonction du récepteur GABA_A (Akk *et al.*, 2005, 2009), deux sites d'interaction directe, impliquant des résidus conservés, ont été récemment proposés. Les résidus Ile²³⁸ et Gln²⁴¹ appartenant au DTM1 et les résidus Asn⁴⁰⁷ et Tyr⁴¹⁰ situés dans le DTM4 de la sous-unité α , participent aux effets potentialisateurs des stéroïdes neuroactifs. De plus, le résidu Thr²³⁶ de la sous-unité α et la Tyr²⁸⁴ de la sous-unité β joueraient plutôt un rôle dans l'ouverture directe du canal chlore par de fortes concentrations de stéroïdes (Hosie *et al.*, 2006 ; Mitchell *et al.*, 2008).

2.1.4. L'éthanol

Un certain nombre d'actions pharmacologiques de l'éthanol (EtOH) sont similaires à celles produites par les BZ et les barbituriques. En particulier, les études comportementales, biochimiques et électrophysiologiques révèlent que de fortes concentrations d'EtOH (≥ 100 mM) potentialisent l'activité de la plupart des récepteurs GABA_A, quelle que soit leur composition en sous-unités, l'effet sur la réponse au GABA étant d'autant plus marquée que la chaîne carbonée des alcools linéaires est longue (Wallner *et al.*, 2006 ; Korpi *et al.*, 2007 ; Lobo and Harris, 2008). Cet effet serait relayé par l'augmentation de la fréquence d'ouverture et du temps d'ouverture du canal (Tatebayashi *et al.*, 1998). Cependant, la grande

majorité des récepteurs présents au niveau synaptique, de type $\alpha\beta\gamma_2$, sont insensibles à des concentrations d'EtOH inférieures à 30 mM, correspondant environ à 1,5 g/L de sang (Olsen *et al.*, 2007 ; Santhakumar *et al.*, 2007). De fait, l'analyse des courants évoqués par le GABA et des études comportementales (locomotion) sur des complexes recombinants, ont permis d'identifier un site de haute affinité sur des récepteurs de type $\alpha_4\beta_2\delta$, pour lesquels la réponse au GABA est potentialisée dès les concentrations de 1-3 mM (Sundstrom-Poromaa *et al.*, 2002 ; Wallner *et al.*, 2003 ; Hanchar *et al.*, 2005). Ces données sont toutefois controversées puisque des travaux réalisés sur des cellules natives, *i.e.* les cellules en grain du gyrus dentelé et du cervelet, qui expriment des récepteurs composés des sous-unités $\alpha_4\beta_3\delta$ et $\alpha_6\beta_3\delta$, respectivement, présentent une forte affinité pour l'EtOH (Carta *et al.*, 2004 ; Wei *et al.*, 2004 ; Liang *et al.*, 2006). En revanche, deux études n'ont pas réussi à reproduire ces résultats sur des homogénats de cerveau de Rat et des lignées cellulaires exprimant le récepteur recombinant (Korpi *et al.*, 2007 ; Mehta *et al.*, 2007). La localisation extrasynaptique de la sous-unité δ , participant à ce que l'on appelle l'inhibition tonique de l'activité neuronale, laisse suggérer que l'EtOH, à des concentrations inférieures à 10 mM, potentialise la transmission GABAergique tonique et non synaptique (Farrant and Nusser, 2005).

Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation des résidus Ser²⁷⁰ et Ala²⁹¹, respectivement situés dans le DTM2 et le DTM3 de la sous-unité α_1 , confère une insensibilité aux anesthésiques, mais également à l'EtOH (Mihic *et al.*, 1997 ; Findlay *et al.*, 2001). Sur des complexes $\alpha_4\beta_3\delta$, des études ont montré qu'une BZ, le Ro15-4513, est capable de bloquer l'effet d'une concentration d'EtOH inférieure à 10 mM. Pour des concentrations supérieures à 30 mM, l'effet de l'EtOH est totalement bloqué par l'application de Ro15-4513 associée à la substitution du résidu Asn²⁶⁵ en Met²⁶⁵ de la sous-unité β_3 (Wallner *et al.*, 2006). Ces données indiquent l'existence de deux sites de liaison distincts pour l'EtOH sur le récepteur GABA_A (Figure 8) (Wallner *et al.*, 2006 ; Zeller *et al.*, 2008).

2.1.5. Les ions

Certains cations di- ou trivalents peuvent modifier l'affinité du récepteur GABA_A pour le GABA ou le TBPS, et ainsi entraîner une modulation des courants évoqués par le GABA (Im and Pregenzer, 1993 ; Gravielle *et al.*, 1999). Le mercure (Hg^{2+}), les lanthanides (Ln^{3+}), l'aluminium (Al^{3+}), le terbium (Tb^{3+}) et le magnésium (Mg^{2+}) potentialisent la réponse au GABA tandis que le zinc (Zn^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) l'inhibent (Tableau 3) (Ma and Narahashi, 1993 ; Narahashi *et al.*, 1994 ; Trombley, 1998 ; Palasz and Czekaj, 2000 ; Fonfria *et al.*, 2001 ; Möykkynen *et al.*, 2001 ; Hosie *et al.*, 2003 ; Mathie *et al.*, 2006). Sur certains types cellulaires comme les cônes rétiniens de Tortue ou les cellules horizontales de Poisson-chat, le cobalt (Co^{2+}), le nickel (Ni^{2+}) et le cadmium (Cd^{2+}) interagissent également avec le récepteur GABA_A et exercent un effet inhibiteur sur le courant évoqué par le GABA (Kaneko and Tachibana, 1986 ; Curtis and Gynther, 1987 ; Kaneda *et al.*, 1997).

L'effet des ions Ln^{3+} dépend toutefois de la composition en sous-unités puisque la présence de l'isoforme α_6 au sein du pentamère transforme l'effet potentialisateur de ces ions en un effet inhibiteur de la réponse au GABA (Saxena and Macdonald, 1996 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Barila *et al.*, 2001). Les ions Cu^{2+} et Zn^{2+} se fixent sur un site commun (Sharonova *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2002) tandis que les ions Ln^{3+} agissent sur un site distinct (Narahashi *et al.*, 1994 ; Palasz and Czekaj, 2000). Des études associant modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée ont permis de montrer que le Zn^{2+} possède 3 sites de liaison sur un récepteur de type $\alpha_1\beta_3$, deux localisés au niveau de l'extrémité N_{term} à l'interface des sous-unités α et β impliquant les résidus Glu¹⁸² de β_3 d'une part, et Glu¹³⁷ et His¹⁴¹ de α_1 d'autre part, et un troisième situé dans le canal, formé des résidus His²⁶⁷ et Glu²⁷⁰ de β_3 (Figure 8) (Dunne *et al.*, 2002 ; Hosie *et al.*, 2003).

2.2. Régulation par des mécanismes intracellulaires

2.2.1. La phosphorylation du récepteur GABA_A

La phosphorylation joue un rôle primordial dans la modulation de la fonction du récepteur GABA_A puisqu'elle *i)* modifie les propriétés intrinsèques du canal chlore, *i.e.* sa

probabilité/durée d'ouverture ou sa désensibilisation, *ii)* affecte l'adressage à la membrane et/ou la dégradation du récepteur et *iii)* contrôle l'action de certains modulateurs allostériques de la fonction GABAergique. La large boucle intracellulaire i_2 des sous-unités du récepteur GABA_A, située entre les DTM3 et DTM4, présente de nombreux sites consensus de phosphorylation au niveau de résidus Ser/Thr et Tyr (Figure 9) (Brandon *et al.*, 2002a). Grâce à la méthode de *GST pull-down*, dans laquelle les boucles i_2 de chacune des sous-unités du récepteur GABA_A sont fusionnées à la Glutathion-S-Transférase (GST), la phosphorylation *in vitro* d'un certain nombre de résidus spécifiques des sous-unités β_{1-3} et γ_2 , a pu être mise en évidence (Brandon *et al.*, 2002a). Ces études ont montré que les sous-unités β_{1-3} possèdent un site principal de phosphorylation au niveau d'une sérine conservée (Ser⁴⁰⁹ pour β_1 et β_3 , Ser⁴¹⁰ pour β_2), substrat des protéines kinases A (PKA), C (PKC) et G (PKG) ainsi que de la protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante (CamKII). De plus, la PKC peut catalyser la phosphorylation de β_3 sur une Ser⁴⁰⁸, la CamKII sur une Ser³⁸⁴/Ser³⁸³ de β_3/β_1 , et la protéine tyrosine kinase (PTK) Src, sur les Tyr³⁸³ et Tyr³⁸⁵ de β_1 (Figure 9) (McDonald and Moss, 1994, 1997 ; Moss *et al.*, 1995 ; Valenzuela *et al.*, 1995b ; Moss and Smart, 1996 ; Brandon *et al.*, 2002a ; Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009). La sous-unité γ_2 présente à elle seule un grand nombre de résidus dont la phosphorylation *in vitro* a pu être démontrée. En effet, la

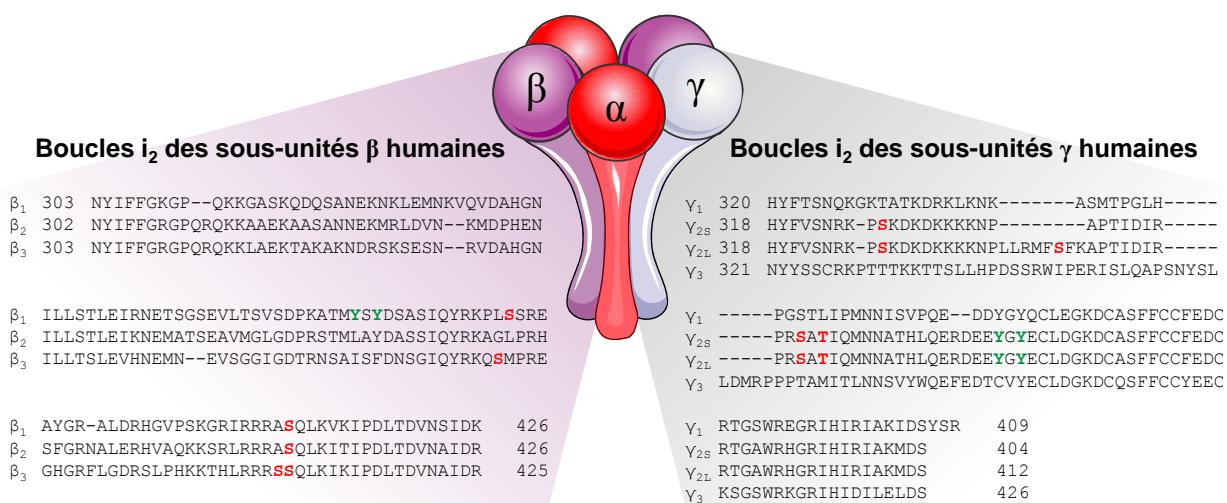


Figure 9 : Sites réels de phosphorylation identifiés sur la boucle i_2 des sous-unités β et γ humaines. L'alignement des séquences formant les boucles i_2 des sous-unités β (*gauche*) et γ (*droite*), obtenues dans les bases de données du *National Center for Biotechnology Information*, a été réalisé à l'aide du logiciel ClustalX selon la méthode du *neighbour joining*. Les résidus phosphorylés par des sérine/thréonine kinases et tyrosine kinases sont indiqués en rouge et en vert, respectivement.

PKC, la Cam KII et la PTK phosphorylent les résidus Ser³²⁷, Ser³⁴⁸/Thr³⁵⁰ et Tyr³⁶⁵/Tyr³⁶⁷, respectivement (Figure 9) (Moss *et al.*, 1992, 1995 ; McDonald and Moss, 1994, 1997 ; Valenzuela *et al.*, 1995b ; Brandon *et al.*, 2002a ; Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009). La forme longue de la sous-unité γ_2 (γ_{2L}) présente un site consensus supplémentaire de phosphorylation, la Ser³⁴³, substrat de la PKC et de la CamKII (Figure 9) (Moss *et al.*, 1992 ; Krishek *et al.*, 1994 ; Moss and Smart, 1996 ; Kittler and Moss, 2003).

Rôles de la Protéine Kinase A

Les études menées sur des complexes recombinants $\alpha_1\beta_X\gamma_2S$ exprimés dans la lignée cellulaire HEK293 ont révélé que seules les sous-unités β_1 et β_3 étaient effectivement phosphorylées par la PKA (Ser⁴⁰⁹ pour β_1 ; Ser⁴⁰⁸ et Ser⁴⁰⁹ pour β_3) (Moss *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1998). La phosphorylation de la Ser⁴⁰⁹ de la sous-unité β_1 par la PKA a pour conséquence d'inhiber l'activité du récepteur GABA_A alors que la phosphorylation des deux résidus adjacents Ser⁴⁰⁸ et Ser⁴⁰⁹ de la sous-unité β_3 favorise plutôt la fonction GABAergique (McDonald *et al.*, 1998). La mutation de la Ser⁴⁰⁸ en Ala⁴⁰⁸ de cette sous-unité transforme la potentialisation du courant chlore induite par la PKA en une inhibition, mimant ainsi les conséquences de la phosphorylation par une PKA sur β_1 (McDonald *et al.*, 1998). En revanche, des données plus récentes ont mis en évidence que la phosphorylation de la Ser⁴⁰⁹ par la PKA sur β_1 ou sur β_3 entraîne dans les deux cas une augmentation de la constante rapide de désensibilisation et un allongement de la déactivation (Hinkle and Macdonald, 2003). Des expériences de *GST pull-down*, de co-immunoprecipitation et d'immunocytochimie sur des récepteurs natifs et recombinants, ont montré que l'action de la PKA dépend de protéines d'ancre, appelées AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*), qui interagissent spécifiquement avec les boucles i_2 des sous-unités β_1 et β_3 , et servent d'adaptateurs pour la PKA (Michel and Scott, 2002 ; Wang *et al.*, 2002 ; Brandon *et al.*, 2003).

In situ, l'activation des PKA est responsable d'une baisse de l'activité de récepteurs GABA_A exprimés dans des ganglions cervicaux, des neurones de la moelle épinière, des cellules en grain du cervelet, ou des cellules pyramidales de l'hippocampe (Porter *et al.*,

1990 ; Moss *et al.*, 1992 ; Robello *et al.*, 1993 ; Poisbeau *et al.*, 1999 ; Flores-Hernandez *et al.*, 2000). En revanche, le rôle de la PKA se traduit par une augmentation de l'activité GABAergique dans les neurones du gyrus dentelé de l'hippocampe, les neurones de Purkinje et les cellules en grain du bulbe olfactif (Kano and Konnerth, 1992 ; Kano *et al.*, 1992 ; Nusser *et al.*, 1999). Certains récepteurs sont capables de réguler l'activité de protéines kinases, et par conséquent modulent l'activité du récepteur GABA_A. Par exemple, l'activation du récepteur dopaminergique D₁ dans les neurones du striatum inhibe les courants évoqués par le GABA *via* principalement la phosphorylation de la sous-unité β₁ par la PKA (Yan and Surmeier, 1997 ; Flores-Hernandez *et al.*, 2000). A l'inverse, l'activation des récepteurs D₃ et D₄ conduit à une inhibition de l'activité de la PKA responsable d'une baisse de l'activité GABAergique dans les neurones du noyau accumbens et les neurones pyramidaux du cortex préfrontal, respectivement (Wang *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2006).

Rôles de la Protéine Kinase G

L'activation de la PKG, induite par une augmentation de la production de GMPc par la guanylyl cyclase soluble sous l'effet du monoxyde d'azote (NO), conduit à une diminution du courant évoqué par le GABA dans les cellules en grain de l'hippocampe (Zarri *et al.*, 1994), du cervelet (Robello *et al.*, 1996), dans les cellules mélanotropes de Grenouille (Castel *et al.*, 2000), et dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale de Rat (Bie and Zhao, 2001). Cependant, des études ont mis en évidence que l'application d'analogues du GMPc entraîne une potentiation de la réponse au GABA dans les ovocytes de Xénope exprimant les complexes α₁β₂γ_{2L} ou dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale de Grenouille (Bradshaw and Simmons, 1995 ; Leidenheimer, 1996). Depuis les travaux de McDonald and Moss (1994) démontrant que le résidu Ser⁴⁰⁹ de la sous-unité β₁ est phosphorylé *in vitro* par la PKG, aucune étude n'a permis d'identifier *in vivo* les résidus cibles de la PKG impliqués dans la régulation du récepteur GABA_A (McDonald and Moss, 1994).

Rôles de la Protéine Kinase C

Des différences entre les effets de la PKA et de la PKC ont été clairement démontrées sur l'activité de récepteur-complexes GABA_A recombinants exprimés dans la lignée HEK293 (Brandon *et al.*, 2002a), ainsi que dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe ou les cellules en grain du gyrus dentelé (Poisbeau *et al.*, 1999). L'activation de la PKC par des esters de phorbol, entraîne une inhibition de la réponse au GABA sur des complexes recombinants de type $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S/L}$ (Krishek *et al.*, 1994), $\alpha_5\beta_2\gamma_{2S/L}$ (Sigel *et al.*, 1991), et $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (Kellenberger *et al.*, 1992). Les études de mutagenèse dirigée ont révélé que cet effet est relayé par la phosphorylation des résidus Ser⁴⁰⁹ de β_1 (Krishek *et al.*, 1994), Ser⁴¹⁰ de β_2 (Kellenberger *et al.*, 1992), Ser³²⁷ de γ_{2S} et γ_{2L} (Kellenberger *et al.*, 1992 ; Krishek *et al.*, 1994) et/ou Ser³⁴³ de γ_{2L} (Krishek *et al.*, 1994). A l'inverse, l'introduction du fragment catalytique de la PKC (PKM) dans la lignée de fibroblastes L929 transfectée par les ADNc codant les sous-unités α_1 , β_1 et γ_{2L} (Lin *et al.*, 1994, 1996) ou dans les neurones pyramidaux de l'aire CA1 de l'hippocampe (Poisbeau *et al.*, 1999) stimule le courant évoqué par le GABA. L'expression de complexes $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$ présentant les mutations $\beta_1^{\text{Ser}409\text{Ala}}$, $\gamma_{2L}^{\text{Ser}343\text{Ala}}$ ou $\gamma_{2L}^{\text{Ser}343\text{Ala}}$ abolit les effets du PKM (Lin *et al.*, 1996).

Sur des extraits de neurones corticaux, Brandon *et al.* (2000) ont montré que l'inhibition de l'activité de la PKC par la calphostine C, provoque une augmentation de l'amplitude des courants évoqués par le GABA, associée à la baisse du niveau de phosphorylation de β_3 , suggérant l'existence d'une phosphorylation constitutive des résidus Ser⁴⁰⁸ et Ser⁴⁰⁹ par la PKC. De même, l'utilisation d'anticorps spécifiques du fragment 359-372 de la sous-unité γ_{2L} , a permis de mettre en évidence la phosphorylation constitutive des résidus Tyr³⁶⁵ et Tyr³⁶⁷ (Brandon *et al.*, 2001).

Les isoformes β II et α de la PKC sont capables d'interagir directement avec la boucle i₂ des sous-unités β du récepteur GABA_A (Brandon *et al.*, 1999, 2002a ; Kittler and Moss, 2003). Ce domaine de liaison comprend notamment le résidu Ser⁴⁰⁹ conservé, dont la phosphorylation par la PKA inhibe la liaison de la PKC (Brandon *et al.*, 2002a). La protéine d'ancrage *Receptor for Activated C-Kinase* (RACK-1) se lie aux sous-unités β ,

indépendamment de la PKC, au niveau des résidus adjacents 395 à 404, et favorise l'action de la PKC (Brandon *et al.*, 1999, 2002b). Des peptidomimétiques correspondant aux résidus 395 à 404 des sous-unités β antagonisent la liaison de RACK-1, et diminuent ainsi le niveau de phosphorylation du récepteur GABA_A par la PKC (Brandon *et al.*, 2002b).

Les premières études attribuent l'inhibition de la fonction GABAergique induite par la PKC à une modification des propriétés intrinèques du canal associé au récepteur GABA_A, *i.e.* une baisse de la conductance chlore et un ralentissement de la cinétique de désensibilisation résultant d'une plus faible affinité du récepteur pour le GABA (Kellenberger *et al.*, 1992). Ces effets seraient relayés en partie par une diminution du nombre de récepteurs exprimés au niveau de la membrane plasmique (Chapell *et al.*, 1998 ; Connolly *et al.*, 1999 ; Filippova *et al.*, 2000). Ces données sont corroborées par des travaux montrant que l'internalisation de complexe-récepteurs $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ induite par la PKC requiert la sous-unité γ , selon un processus dépendant de la dynamine (Kittler *et al.*, 2000b ; Herring *et al.*, 2003, 2005).

La fonction du récepteur GABA_A peut être modifiée par l'activation de récepteurs dont les voies de signalisation impliquent la PKC. C'est le cas des récepteurs muscarinique M1 et sérotoninergiques 5-HT₄ qui tous deux inhibent les courants évoqués par le GABA *via* la régulation de la protéine adaptatrice RACK-1 (Feng *et al.*, 2001 ; Brandon *et al.*, 2002b). De plus, l'activation des récepteurs tyrosine kinase tels que le *platelet-derived growth factor receptor* provoque une inhibition du courant évoqué par le GABA dans les neurones CA1 de l'hippocampe de Rat, les vésicules membranaires préparées à partir de cerveau de Souris ou les ovocytes de Xénopé, par un mécanisme impliquant une PKC (Valenzuela *et al.*, 1995a). Par l'intermédiaire de son récepteur TrkB, le *brain-derived neurotrophic factor* exerce un contrôle bidirectionnel de la fonction GABAergique dans les neurones de l'hippocampe : la phosphorylation des résidus Ser^{408/409} de la sous-unité β_3 , par le recrutement de la PKC, potentialise d'abord le courant chlore, suivi d'une inhibition de l'amplitude des PPSI suite à la déphosphorylation de β_3 par le recrutement de la protéine phosphatase PP2A (Jovanovic *et al.*, 2004).

Rôles de la Protéine Calcium/Calmoduline Kinase II

Les variations de la $[Ca^{2+}]_c$ jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'activité du récepteur GABA_A, soit en modifiant directement les propriétés du canal, soit en agissant de concert avec la calmoduline pour activer la CamKII. Les premières études ont été menées par Chen *et al.* (1990) sur des neurones dissociés de l'hippocampe dans lesquels l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ accélère la décroissance du courant au cours du temps (*run-down*) *via* un processus dépendant de la calmoduline. A l'appui de cette hypothèse, la dialyse intracellulaire de la sous-unité catalytique α de la CamKII potentialise le courant évoqué par le GABA au niveau des cellules de Purkinje, des neurones CA1 de l'hippocampe et des neurones de la racine dorsale de Rat (Wang *et al.*, 1995 ; Kano *et al.*, 1996). Des travaux récents menés sur les neurones en grain du cervelet ont mis en évidence que l'activation de la CamKII se traduit par une augmentation de l'amplitude et une prolongation de la durée des PPSI *via* les sous-unité β_2 et β_3 , respectivement (Houston *et al.*, 2008). De plus, l'inhibition des PP1, 2A et 2B (calcineurine), entraîne une potentialisation du courant et une accélération de sa cinétique de désensibilisation (Wang *et al.*, 1995 ; Kano *et al.*, 1996).

Rôles de la Protéine Tyrosine Kinase

La phosphorylation par une PTK des récepteurs GABA_A natifs provoque une augmentation de la transmission GABAergique. Ainsi, les courants évoqués par le GABA au niveau de neurones du tronc cérébral, de la bande diagonale de Broca, du ganglion cervical et des cellules en grain du cervelet de Rat, sont potentialisés par une kinase Src de type pp60^{c-src} et/ou diminués par des applications intra- ou extracellulaires de genistein, un inhibiteur spécifique de PTK (Moss *et al.*, 1995 ; Jassar *et al.*, 1997 ; Wan *et al.*, 1997 ; Amico *et al.*, 1998). La sous-unité γ_{2L} a été identifiée comme substrat majeur de la PTK Src, qui phosphoryle constitutivement la sous-unité au niveau des résidus Tyr³⁶⁵ et Tyr³⁶⁷ (Brandon *et al.*, 2001).

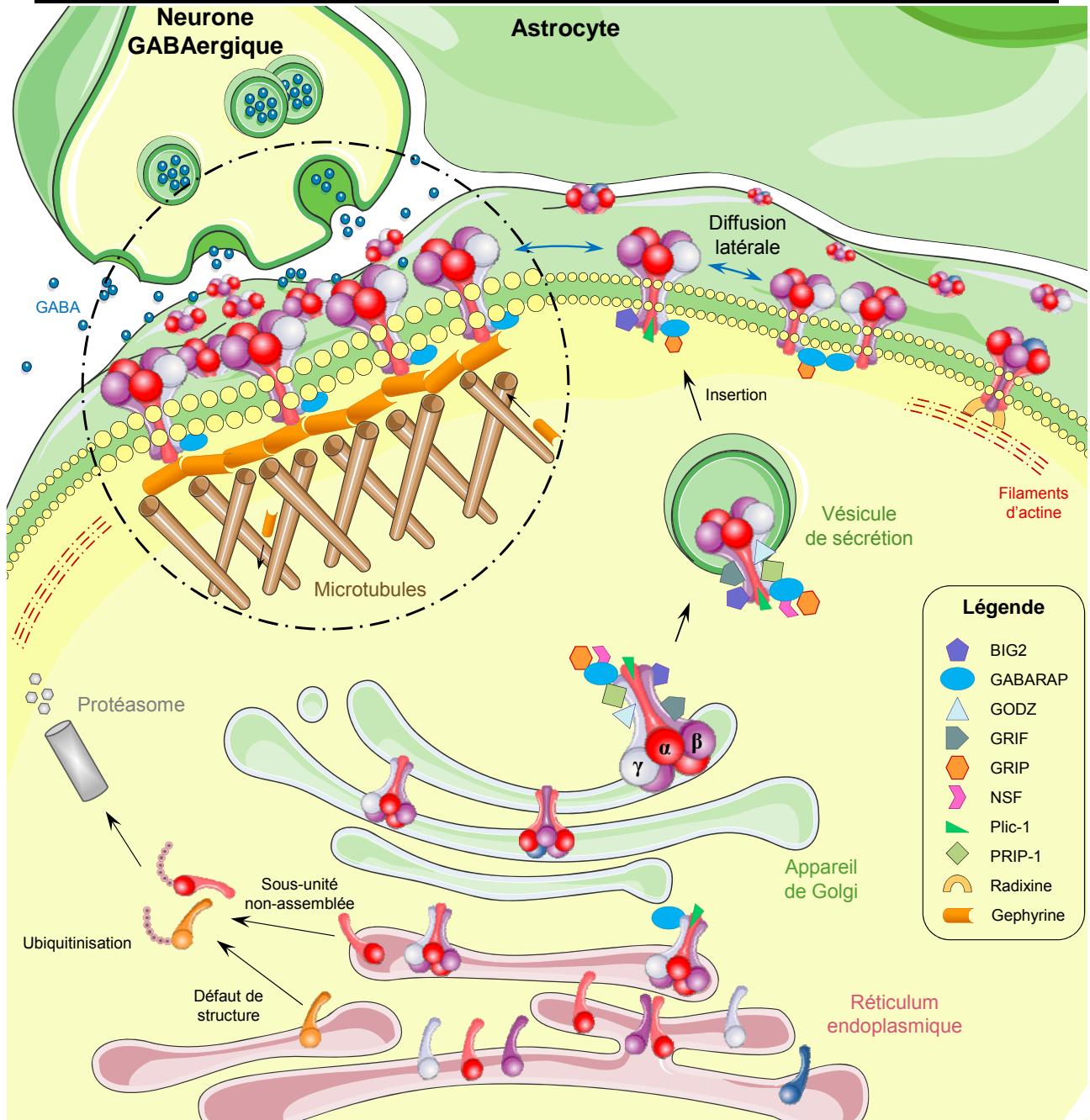


Figure 10 : Adressage et regroupement des sous-unités du récepteur GABA_A. Les sous-unités du récepteur GABA_A sont synthétisées puis assemblées en complexes pentamériques au sein du réticulum endoplasmique *via* un processus hautement régulé, notamment par leur association à la protéine Plic-1, qui se lie aux sous-unités α et β et facilite l'accumulation des récepteurs GABA_A au niveau de la synapse en inhibant leur dégradation. Les sous-unités isolées subissent une ubiquitinisation et sont ensuite envoyées vers le protéasome pour dégradation. Le processus d'adressage, depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique, est ensuite contrôlé par des protéines qui s'associent aux différentes sous-unités du récepteur GABA_A : GABARAP se lie à γ_2 et facilite le transport des récepteurs au sein de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane ; NSF et BIG2 s'associent aux sous-unités β au sein de l'appareil de Golgi et régulent l'adressage ; la palmitoylation des sous-unités γ intervient également au sein de l'appareil de Golgi par leur liaison à GODZ et constitue une étape essentielle pour l'adressage des récepteurs à la membrane ; les protéines GRIF régulent également l'adressage, tout comme les protéines PRIP, qui modulent le niveau de phosphorylation des sous-unités β et γ . L'insertion des récepteurs s'effectue dans la région extrasynaptique, d'où ils pourront diffuser vers la synapse. La diffusion latérale (flèches bleues) au sein de la membrane plasmique permet des échanges entre des récepteurs isolés et des *clusters* de récepteurs synaptiques ou extrasynaptiques. La localisation synaptique de récepteurs comportant une sous-unité α_2 est maintenue grâce à une interaction directe à la géphyrine, qui elle-même se lie aux microtubules. La localisation extrasynaptique de certains complexes peut être contrôlée par la radixine, qui interagit directement avec les filaments d'actine.

L'insuline entraîne le recrutement rapide de récepteurs GABA_A au niveau de la membrane post-synaptique, consécutif à la phosphorylation de la sous-unité β_2 par la séro/thréonine kinase Akt (également appelée protéine kinase B) au niveau de son résidu Ser⁴¹⁰ (Wan *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2003). Les récents travaux de cette équipe ont démontré que la liaison de l'insuline à son récepteur stimule la PI3-kinase, entraînant ainsi l'association du domaine SH2 de sa sous-unité régulatrice p85 à la boucle i_2 de la sous-unité β_2 au niveau d'un motif contenant 2 résidus tyrosine phosphorylés (Tyr³⁷² et Tyr³⁷⁹) (Vetiska *et al.*, 2007). Cette interaction provoque l'activation de la protéine Akt, à l'origine de l'augmentation du nombre de récepteurs GABA_A au niveau de la membrane post-synaptique, qui conduit à une potentialisation des courants post-synaptiques inhibiteurs évoqués par le GABA (Wan *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2003).

2.2.2. Régulation du récepteur GABA_A par des protéines partenaires

Chacune des étapes liées à l'expression (assemblage au sein du RE, insertion dans la membrane plasmique), la fonction et l'internalisation (recyclage et dégradation) du récepteur GABA_A requiert l'association de protéines spécifiques aux différentes sous-unités du pentamère. Pour l'ensemble des sous-unités du récepteur GABA_A, la boucle intracellulaire cytoplasmique i_2 présente la plupart des séquences d'interaction aux différentes protéines impliquées dans la régulation de la fonction GABAergicue.

Transport, maturation et repliement du récepteur GABA_A dans la voie de sécrétion

Dès leur translocation dans le RE, les sous-unités du récepteur GABA_A interagissent avec au moins 3 protéines chaperons, *i.e.* la BiP, la calnexine et la protéine disulfide isomérase, capables de reconnaître des domaines de protéines en cours d'elongation, et dont le rôle est de participer au repliement approprié et à l'assemblage des sous-unités entre elles (Figure 4) (Sarto-Jackson and Sieghart, 2008). La protéine BiP, une protéine abondante dans le RE, se lie spécifiquement aux régions hydrophobes (Pelham, 1989) afin d'écartier rapidement les protéines présentant des anomalies de structure qu'elle dirige alors vers la voie de dégradation

associée au RE (Figure 10) (Kleizen and Braakman, 2004). La calnexine, constituant intrinsèque de la membrane du RE qui reconnaît les glycanes immatures (Hammond and Helenius, 1994), empêche également le déplacement des protéines non correctement repliées dans la voie de sécrétion (Helenius and Aebi, 2004). Des études d'immunoprecipitation ont permis de mettre en évidence que les sous-unités du récepteur GABA_A isolées ou associées en binômes ($\alpha_1\gamma_2L$ et $\beta_2\gamma_2L$) étaient retenues dans le RE via leur association à la BiP et la calnexine (Connolly *et al.*, 1996) qui possèdent une séquence consensus de rétention dans le RE (Lys-Arg-Glu-Leu), dirigeant ces complexes non assemblés vers la voie de dégradation du protéasome (Figure 10) (Kleizen and Braakman, 2004 ; Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009). La protéine disulfide isomérase catalyse l'oxydation des groupements SH de deux cystéines afin de former un pont disulfure à l'extrémité N_{term} de chaque sous-unité du récepteur GABA_A (Figure 10), permettant leur stabilisation et leur transport (Sarto-Jackson and Sieghart, 2008).

Des expériences de double-hybride ont permis de mettre en évidence que certaines sous-unités du récepteur GABA_A interagissent avec la protéine Plic-1 (*proteins linking integrin-associated protein and cytoskeleton*) ou ubiquilin dans le RE (Bedford *et al.*, 2001). Ces travaux ont démontré l'existence d'une interaction spécifique de Plic-1 aux résidus 346 à 355 de la boucle i₂ des sous-unités α_{1-3} , α_6 et β_{1-3} , parmi lesquels les 5 premiers résidus sont conservés (Bedford *et al.*, 2001). L'utilisation d'un peptidomimétique correspondant au domaine de Plic-1 capable de lier la sous-unité α_1 a pour conséquence de réduire l'expression du récepteur GABA_A à la membrane plasmique, alors que la surexpression de Plic-1 favorise au contraire cette expression, sans affecter l'internalisation du récepteur (Bedford *et al.*, 2001 ; Saliba *et al.*, 2008). En effet, les domaines *ubiquitine-like* et de liaison à l'ubiquitine de Plic-1 permettent d'inhiber la dégradation des complexes-récepteurs présents dans le RE, et favorisent ainsi leur insertion à la membrane synaptique (Kleijnen *et al.*, 2000, 2003 ; Saliba *et al.*, 2007, 2008). Au niveau de l'appareil de Golgi, 3 protéines majeures identifiées par double-hybride pourraient interagir avec le récepteur GABA_A, *i.e.* la palmitoyltransférase GODZ (*Golgi-specific DHHC – Asp-His-His-Cys – zinc finger protein*), BIG2 (*brefeldin A-*

inhibited GDP/GTP exchange factor 2) et GABARAP (GABA_A receptor associated protein) (Figure 10). Keller *et al.* (2004) ont démontré qu'un fragment de 14 acides aminés (368-381) de la large boucle intracellulaire i₂ conservé au sein des sous-unités γ_{1-3} se lie à GODZ, permettant ainsi la palmitoylation de ces sous-unités (Keller *et al.*, 2004 ; Rathenberg *et al.*, 2004). La mutation des résidus cystéine de la boucle i₂ de γ_2 , l'inhibition de la palmitoylation ou de l'activité de GODZ (co-expression d'un mutant dominant négatif), bloque la translocation et le regroupement au niveau de la membrane des récepteurs exprimés dans des neurones de l'hippocampe ou du cortex (Rathenberg *et al.*, 2004 ; Fang *et al.*, 2006), démontrant ainsi le rôle indispensable de la palmitoylation dans le fonctionnement de la synapse GABAergique.

BIG2 est un facteur qui catalyse l'échange GDP/GTP des petites protéines G appelées Arf (*ADP-ribosylation factor*), dont le rôle dans le bourgeonnement des vésicules au sein de l'appareil de Golgi est aujourd'hui bien démontré (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). L'interaction de BIG2 avec le récepteur GABA_A est transitoire et spécifique des sous-unités β et met en jeu les résidus 328 à 345 de la sous-unité β_3 (Charych *et al.*, 2004). Notamment, la co-expression de BIG2 avec les sous-unités α_1 , β_3 et γ_{2S} du récepteur GABA_A diminue l'intensité du marquage immunocytochimique périnucléaire suggérant que BIG2 facilite la progression et la sortie des complexes-récepteurs de l'appareil de Golgi (Charych *et al.*, 2004). Les auteurs ont également mis en évidence une co-localisation de BIG2 avec le récepteur GABA_A au niveau de la membrane, montrant ainsi que BIG2 pourrait jouer un rôle dans le transport vers la surface cellulaire des récepteurs nouvellement formés, au sein de vésicules *via* le recrutement de complexes protéiques AP (*Adaptor protein*) (Charych *et al.*, 2004).

GABARAP appartient quant à elle à une famille de petites protéines de liaison aux microtubules, et interagit spécifiquement avec les sous-unités γ_1 , γ_{2S} et γ_{2L} du récepteur GABA_A (acides aminés 35 à 52 de la sous-unité γ_2) *in vitro* et *in vivo* (Wang *et al.*, 1999 ; Nymann-Andersen *et al.*, 2002a). Les premières données obtenues par immunocytochimie et microscopie électronique révèlent que GABARAP est co-localisée avec le récepteur GABA_A

principalement au niveau de l'appareil de Golgi et dans les vésicules synaptiques (Figure 10) (Wang *et al.*, 1999 ; Kittler *et al.*, 2001). Plus récemment, des études d'immunofluorescence et d'électrophysiologie ont démontré que GABARAP joue un rôle majeur dans l'adressage à la membrane des récepteurs GABA_A composés d'une sous-unité γ_2 , et dans le phénomène de potentialisation à long-terme dans le cervelet par le biais du regroupement des récepteurs, ce dernier impliquant le domaine de liaison aux microtubules de GABARAP (acides aminés 1 à 22) (Leil *et al.*, 2004 ; Boileau *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2005, 2007 ; Kawaguchi and Hirano, 2007). Plusieurs équipes attribuent également à la présence de GABARAP au niveau de la synapse une modification des propriétés intrinsèques du canal, *i.e.* une augmentation de la conductance et du temps d'ouverture (Everitt *et al.*, 2004 ; Luu *et al.*, 2006).

La translocation à travers le système de Golgi requiert d'autres protéines. Les protéines PRIP-1 et PRIP-2 (*Phospholipase C-related, catalytically inactive proteins*) peuvent se fixer à GABARAP, inhibant ainsi la liaison de cette dernière à la sous-unité γ_2 (Kanematsu *et al.*, 2002). Des études récentes ont démontré une association directe des protéines PRIP aux boucles i_2 des 3 isoformes β du récepteur GABA_A et, plus faiblement, à celle de la sous-unité γ_2 . Cette liaison est responsable de la régulation du niveau de phosphorylation (*via* le recrutement de protéines phosphatases) et de l'expression des complexes pentamériques (Figure 10) (Terunuma *et al.*, 2004 ; Kanematsu *et al.*, 2006 ; Mizokami *et al.*, 2007). L'invalidation des gènes codant les protéines PRIP ou le blocage de la liaison de PRIP-1 aux sous-unités β inhibe l'expression de récepteurs GABA_A composés d'une sous-unité γ_2 , suggérant l'existence d'un complexe trimérique entre GABARAP, PRIP et la sous-unité β qui favorise l'interaction entre GABARAP et la sous-unité γ_2 (Kanematsu *et al.*, 2006, 2007b ; Mizokami *et al.*, 2007). Le facteur NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), classiquement impliqué dans le transport et la fusion des vésicules synaptiques (Whiteheart and Matveeva, 2004), s'associe également aux sous-unités β (résidus 395 à 415) et entraîne une diminution de l'expression du récepteur GABA_A par défaut d'insertion dans les membranes plasmiques (Goto *et al.*, 2005).

Stabilité du récepteur GABA_A au niveau de la synapse

Le regroupement et la stabilité des récepteurs GABA_A nouvellement adressés à la membrane dépend d'une protéine particulière, la géphyrine, impliquée aussi dans le regroupement synaptique des récepteurs glycinergiques (Pfeiffer *et al.*, 1982 ; Kneussel *et al.*, 1999 ; Waldvogel *et al.*, 2010). L'inhibition de l'expression de la géphyrine (par siARN) ou l'invalidation de son gène, affecte la localisation synaptique de la majorité des sous-unités du récepteur GABA_A (Essrich *et al.*, 1998 ; Baer *et al.*, 1999 ; Kneussel *et al.*, 1999, 2001 ; Fischer *et al.*, 2000 ; Levi *et al.*, 2004), mais ne modifie pas celle des sous-unités α_1 et α_5 (Kneussel *et al.*, 2001). Inversement, les souris knock-out pour le gène codant la sous-unité γ_2 présentent une importante réduction de l'expression de la géphyrine au niveau synaptique (Essrich *et al.*, 1998), alors que l'induction de γ_2 dans des neurones restaure l'expression de la géphyrine au niveau post-synaptique (Essrich *et al.*, 1998 ; Alldred *et al.*, 2005). Récemment, Tretter *et al.* (2008) ont caractérisé un motif de 10 acides aminés au sein de la boucle i_2 de la sous-unité α_2 , site d'interaction à la géphyrine, et responsable du regroupement des récepteurs à la membrane de neurones de l'hippocampe. Des enregistrements électrophysiologiques complétés par des données de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) indiquent que les récepteurs GABA_A localisés au niveau de la membrane post-synaptique sont moins mobiles que ceux situés dans des régions extrasynaptiques, mais retrouve une mobilité après invalidation du gène de la géphyrine, démontrant ainsi le rôle de la protéine dans l'ancrage des récepteurs au niveau de la synapse (Figure 10) (Jacob *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2005).

Le regroupement de certaines sous-unités du récepteur GABA_A n'est pas affecté chez des souris knock-out pour le gène codant la géphyrine, suggérant l'implication d'autres protéines dans ce processus (Kneussel *et al.*, 2001). Une étude récente a mis en évidence que la radixine, une protéine de la famille des ERM (Erzine/Radixine/Moésine) qui permet de lier les protéines membranaires aux filaments d'actine, interagit spécifiquement avec la sous-unité α_5 du récepteur GABA_A par l'intermédiaire de son domaine FERM (*Four-point-one-ERM*) (Loebrich *et al.*, 2006). En effet, l'inhibition de l'expression de la radixine (par siARN) ou de

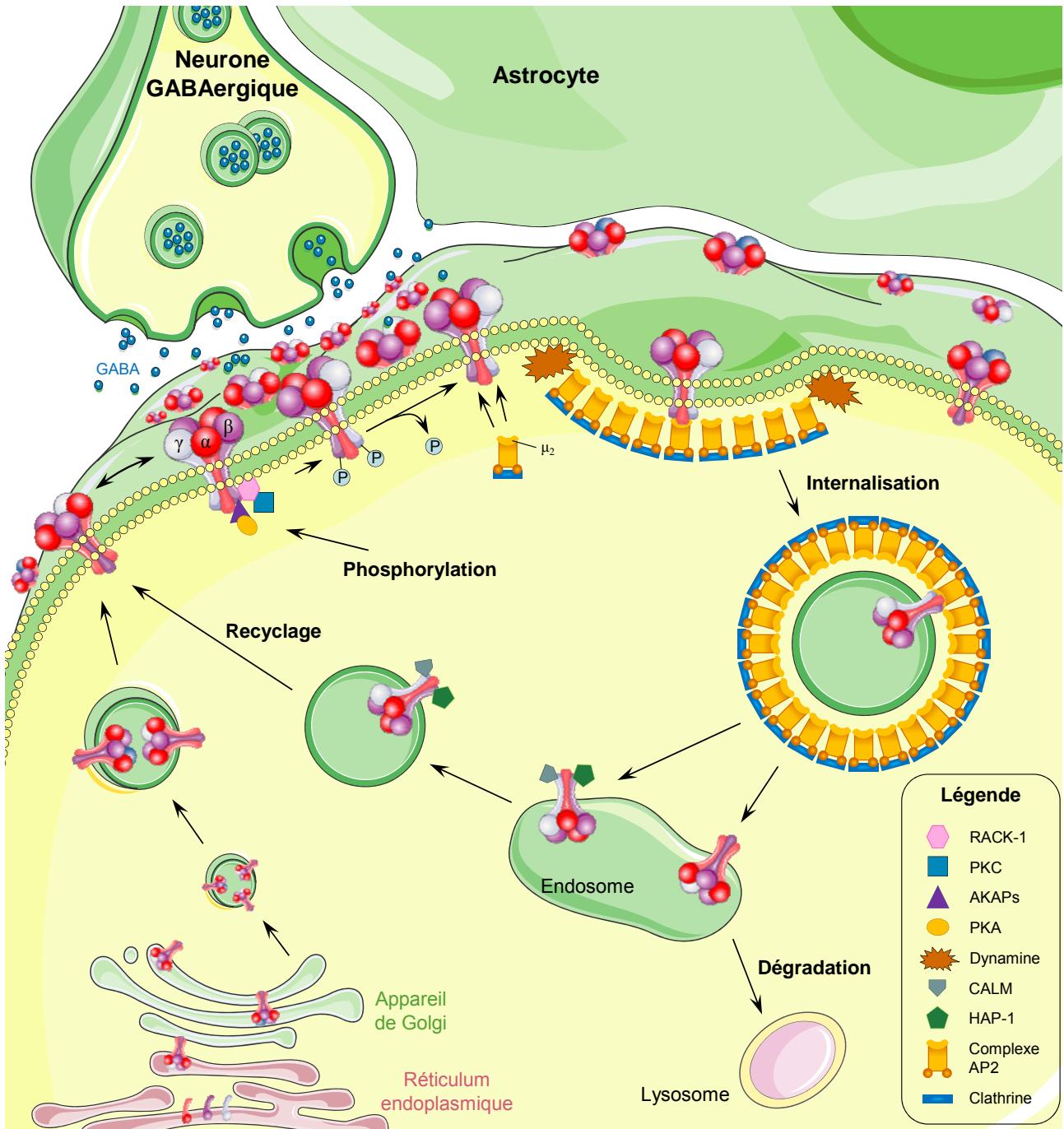


Figure 11 : Régulation de l'endocytose et du recyclage des récepteurs GABA_A. L'endocytose des récepteurs GABA_A est un processus extrasynaptique, qui dépend de la dynamine et de la formation de puits de clathrine. L'internalisation du récepteur GABA_A implique l'interaction de la boucle i_2 des sous-unités β et γ avec la sous-unité μ_2 du complexe AP2. Lorsque des résidus situés au sein du motif d'interaction de μ_2 avec les sous-unités β et γ sont phosphorylés par les PKA, PKC et/ou RACK-1, la liaison de μ_2 est inhibée, ce qui augmente le nombre de récepteurs synaptiques. Après fusion des vésicules d'internalisation aux endosomes, le devenir des récepteurs GABA_A dépend de la fixation de deux protéines : HAP-1 et CALM. L'interaction de HAP-1 avec les sous-unités β , d'une part, et la liaison de la protéine CALM à γ_2 , d'autre part, favorisent le recyclage des récepteurs qui seront ré-adressés à la membrane plasmique. Les récepteurs non associés de l'endosome sont orientés vers le lysosome pour y être dégradés.

sa liaison à la sous-unité α_5 , entraîne une diminution drastique du regroupement de sous-unités α_5 (Loebrich *et al.*, 2006).

La régulation de la fonction des récepteurs GABA_A présents au niveau de la synapse dépend en partie de l'état de phosphorylation de chacune des sous-unités (cf § 2.2.1.). Plusieurs protéines impliquées dans la phosphorylation du récepteur GABA_A interagissent directement avec celui-ci ; c'est le cas de RACK-1, de la PKC et des AKAPs, qui lient la boucle intracellulaire i_2 des sous-unités β (Figure 10) (Brandon *et al.*, 1999, 2002b, 2003 ; Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009). A l'inverse, la déphosphorylation est assurée par les protéines phosphatasées PP1 et PP2A, qui se lient également aux sous-unités β , et par la calcineurine, qui s'associe physiquement à la sous-unité γ_2 (Wang *et al.*, 2003 ; Jovanovic *et al.*, 2004 ; Terunuma *et al.*, 2004 ; Arancibia-Carcamo and Kittler, 2009).

Endocytose et recyclage du récepteur GABA_A

Les récepteurs GABA_A sont renouvelés par un processus d'internalisation qui requiert la formation de puits de clathrine, exclusivement à la périphérie de la région synaptique (Figure 11) (Bogdanov *et al.*, 2006 ; Kittler *et al.*, 2000b). Des travaux rapportent également une internalisation de récepteurs GABA_A impliquant la dynamine et la cavéoline (Bradley *et al.*, 2008), ou bien indépendante de la dynamine, dans le cas des complexes $\alpha\beta$ (Cinar and Barnes, 2001). Les complexes AP sont constitués de quatre sous-unités, de haut poids (α - et β_2 -adaptines pour AP2) et bas poids (μ_2 et σ_2) moléculaires. La protéine AP2 interagit directement avec les boucles i_2 des sous-unités β et γ , par exemple au niveau des acides aminés 401 à 412 pour β_3 , au niveau d'un motif atypique de type dileucine impliqué dans l'internalisation du récepteur GABA_A pour la sous-unité β_2 , ou encore au niveau d'un motif de type TyrXXΦ (où X représente un acide aminé quelconque et Φ un résidu hydrophobe) pour les sous-unités β_2 et γ_2 (Herring *et al.*, 2003 ; Kittler and Moss, 2003 ; Kittler *et al.*, 2005). L'interaction de la sous-unité β avec AP2 permettrait l'internalisation du récepteur dépendante des puits de clathrine et le recrutement de la dynamine (Figure 11) (Kittler *et al.*, 2000b ; Herring *et al.*, 2003, 2005 ; Smith *et al.*, 2008). De plus, les niveaux de base de

Protéine d'interaction		Récepteur GABA _A		Fonction(s)	Autres partenaires	Références
Protéine	Domaine(s) impliqué(s)	Sous-unité(s)	Domaine(s) impliqué(s)			
AKAP79/150	ND	β_1 et β_3	ND	Protéine d'ancrage	PKA, Calcineurine	6
AP2	Pour μ_2 : Sous-domaine A (283-394) Sous-domaine B (407-435)	β_{1-3} , γ_{1-3} et δ	β_{1-3} (401-412), β_2 (402-413) γ_2 (318-327) et γ_2 (361-370)	Internalisation	–	17, 18, 25, 29, 30, 40
BIG2	N_{term} et C_{term}	β_{1-3}	β_3 (328-345)	Adressage	–	8
Calcineurine	Domaine catalytique	γ_2	γ_2 (317-332)	Déphosphorylation	AKAP79	43
GABARAP	a.a. 37-52	γ_1 , γ_{2S} et γ_{2L}	γ_2 (389-394)	Adressage Regroupement	GRIP, PRIP-1, NSF, Géphyrine	9, 10, 11, 12, 13, 14, 26, 27, 31, 32, 35, 36, 43, 44
Géphyrine	ND	α_2	α_2 (336-347)	Regroupement	GABARAP	31, 42
GODZ	DTM et Domaine DHHC	γ_1 , $\gamma_{2S/2L}$ et γ_3	γ_{2S} (368-381)	Palmitoyltransférase	–	15, 24, 37
GRIF-1	a.a. 124-283	β_2	β_2 (348-361) et β_2 (316-339)	Transport antérograde, O-glcNAc transférase	–	1, 7
HAP-1	ND (entre 220 et 520)	β_1	ND	Trafic vésiculaire	–	28, 38
NSF	ND (compétition avec GABARAP)	β_{1-3}	β (395-415)	Adressage	GABARAP	16
PKC	Isoformes α et βII	β_1 et β_3	β_1 (405-415)	Phosphorylation	RACK-1	3, 5
Plic-1	Domaine de liaison à l'ubiquitine	α_{1-3} , α_6 et β_{1-3}	α_1 (346-355)	Stabilisation (RE) Adressage	–	2, 39
PP1, PP2A	ND	β_3	ND	Déphosphorylation	PRIP	19, 21
PRIP	a.a. 544-568 (PRIP-1)	β_{1-3} et γ_2	ND	Régulation de la phosphorylation Internalisation	PP1 α , PP2A, GABARAP	20, 21, 22, 23, 34, 41
RACK-1	ND	α_1 et β_{1-3}	β_1 (395-404)	Protéine d'ancrage	PKC, Src	3, 5
Radixin	Domaine FERM N_{term}	α_5	α_5 (342-357)	Protéine d'ancrage Regroupement	–	33
Src	ND	β_{1-3} et γ_{2L}	ND	Phosphorylation	RACK-1	4, 45

Tableau 4 : Protéines d'interaction aux sous-unités du récepteur GABA_A. La fonction du récepteur GABA_A est contrôlée par de nombreuses protéines qui, en se fixant au niveau de la boucle i_2 des sous-unités, vont assister et/ou réguler l'adressage et/ou l'activité GABAergicue, soit directement, soit en servant de protéine intermédiaire. La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Beck *et al.*, 2002 ; **2**, Bedford *et al.*, 2001 ; **3**, Brandon *et al.*, 1999 ; **4**, Brandon *et al.*, 2001 ; **5**, Brandon *et al.*, 2002b ; **6**, Brandon *et al.*, 2003 ; **7**, Brickley *et al.*, 2005 ; **8**, Charych *et al.*, 2004 ; **9**, Chen *et al.*, 2000 ; **10**, Chen *et al.*, 2005 ; **11**, Chen *et al.*, 2007 ; **12**, Coyle *et al.*, 2002 ; **13**, Everitt *et al.*, 2004 ; **14**, Everitt *et al.*, 2009 ; **15**, Fang *et al.*, 2006 ; **16**, Goto *et al.*, 2005 ; **17**, Herring *et al.*, 2003 ; **18**, Herring *et al.*, 2005 ; **19**, Jovanovic *et al.*, 2004 ; **20**, Kanematsu *et al.*, 2002 ; **21**, Kanematsu *et al.*, 2006 ; **22**, Kanematsu *et al.*, 2007a ; **23**, Kanematsu *et al.*, 2007b ; **24**, Keller *et al.*, 2004 ; **25**, Kittler *et al.*, 2000b ; **26**, Kittler *et al.*, 2001 ; **27**, Kittler *et al.*, 2004a ; **28**, Kittler *et al.*, 2004b ; **29**, Kittler *et al.*, 2005 ; **30**, Kittler *et al.*, 2008 ; **31**, Kneussel *et al.*, 2000 ; **32**, Leil *et al.*, 2004 ; **33**, Loebrich *et al.*, 2006 ; **34**, Mizokami *et al.*, 2007 ; **35**, Nyman-Andersen *et al.*, 2002a ; **36**, Nyman-Andersen *et al.*, 2002b ; **37**, Rathenberg *et al.*, 2004 ; **38**, Rong *et al.*, 2007 ; **39**, Saliba *et al.*, 2008 ; **40**, Smith *et al.*, 2008 ; **41**, Terunuma *et al.*, 2004 ; **42**, Tretter *et al.*, 2008 ; **43**, Wang *et al.*, 1999 ; **44**, Wang and Olsen 2000 ; **45**, Wang *et al.*, 2003. RE, réticulum endoplasmique ; a.a., acide aminé ; ND, non déterminé.

phosphorylation des résidus Ser^{408/409} de la sous-unité β_3 et Tyr^{365/367} de la sous-unité γ_2 , résidus appartenant aux domaines d’interaction à AP2, inhibent la liaison d’AP2 et empêchent l’internalisation constitutive des récepteurs GABA_A (Brandon *et al.*, 2000, 2001).

Le devenir des récepteurs internalisés dépend de la protéine HAP-1 (*Huntingtin associated protein-1*) qui, en se fixant sur la boucle i₂ des sous-unités β , prévient sa dégradation et favorise le recyclage du récepteur GABA_A à la membrane plasmique (Kittler *et al.*, 2004a). En accord avec ces données, des travaux ont mis en évidence que l’inhibition de l’expression de HAP-1 (par siARN) au niveau de l’hypothalamus de Souris, inhibe la prise alimentaire *via* la diminution du nombre de récepteurs GABA_A présents à la membrane plasmique (Sheng *et al.*, 2006). Plus récemment, Yuan *et al.* (2008) ont mis en évidence le rôle de la protéine CAML (*Calcium-Modulating Cyclophilin Ligand*) dans le recyclage du récepteur GABA_A (Figure 11). Cette protéine membranaire du RE serait principalement localisée dans les domaines impliqués dans la recapture du Ca²⁺, et présenterait une portion libre cytoplasmique impliquée dans la reconnaissance d’autres protéines (Holloway and Bram, 1998). L’interaction de CAML avec la sous-unité γ_2 du récepteur GABA_A, suggérée par Yuan *et al.* (2008), mettrait en jeu la région C_{term} de la sous-unité, *i.e.* une portion de la boucle i₂ et le DTM4. L’inhibition de l’expression de la CAML dans des neurones corticaux (par shARN), provoque une diminution du nombre de récepteurs GABA_A post-synaptiques membranaires, associée à un défaut de recyclage de récepteurs internalisés (Yuan *et al.*, 2008). L’ensemble des données concernant les protéines d’interaction aux sous-unités du récepteur GABA_A sont résumées dans le Tableau 4.

Le rôle de certaines protéines partenaires du récepteur GABA_A n’a pas encore été clairement identifié. C’est le cas de la protéine GRIF-1 (*GABA_A Receptor Interacting Factor-1*) dont les acides aminés 124 à 283 interagissent avec le fragment 324 à 354 de la boucle i₂ de la sous-unité β_2 (Beck *et al.*, 2002). GRIF-1 possède 47% d’homologie avec HAP-1, suggérant ainsi qu’elle pourrait jouer un rôle dans l’adressage des récepteurs GABA_A à la membrane (Beck *et al.*, 2002).

Chapitre II : Le système urotensinergique



1. L'urotensine II et l'urotensin II-related peptide

Initialement caractérisée à partir de l'urophyse du Gobie *Glypticthys mirabilis* sur la base de son activité spasmogénique sur le rectum de Truite (Pearson *et al.*, 1980), l'UII a par la suite été identifiée chez d'autres espèces comme le Poisson ventouse *Catostomus commersoni* (McMaster and Lederis, 1983), la Carpe *Cyprinus carpio* (Ichikawa *et al.*, 1984) et le Flétan *Platichthys flesus* (Conlon *et al.*, 1990). L'UII a également été purifiée à partir d'extraits de moelle épinière de Roussette *Scyliorhinus canicula* (Conlon *et al.*, 1992a) et d'Esturgeon *Acipenser ruthenus* (McMaster *et al.*, 1992). Bien qu'il fût longtemps admis que l'expression de l'UII se limitait aux poissons, plusieurs observations plaident en faveur de la présence du peptide chez d'autres espèces. En effet, l'UII de Gobie est capable de provoquer la vasodilatation d'anneaux d'aortes de Perdrix (Muramatsu and Kobayashi, 1979) et de Rat (Gibson, 1987), ou la relaxation du muscle anococygien de Souris (Gibson *et al.*, 1984). Quelques années plus tard, les travaux de Conlon *et al.* (1992b) ont démontré la présence de l'UII dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda*. Depuis, l'UII a été clonée chez plusieurs espèces de Mammifères dont l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Ames *et al.*, 1999), la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999), le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999), le Porc (Mori *et al.*, 1999) et le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002). Plus récemment, en recherchant la forme mature de l'UII dans le cerveau de Rat, Sugo *et al.* (2003) ont isolé un paralogue de l'UII qu'ils ont nommé *UII-related peptide* (URP). Le préproURP a été cloné chez l'Homme et la Souris (Sugo *et al.*, 2003) et par la suite chez le Poulet (Tostivint *et al.*, 2006).

1.1. Les gènes de l'UII et de l'URP

Chez l'Homme, le gène codant la préproUII est localisé dans la région p36 du chromosome 1, celui du préproURP occupant la région q28 du chromosome 3 (Sugo *et al.*, 2003). Les gènes des deux formes de somatostatine, SS1 et SS2, sont présents dans les mêmes régions chromosomiques : le gène de la SS1 est situé à proximité de celui de l'URP tandis que le gène de la SS2, aussi appelée cortistatine (CST), est localisé sur le même locus que celui de l'UII. L'hypothèse selon laquelle les deux tandems *URP/SS1* et *UII/SS2* dériveraient de deux gènes ancestraux, *protoUII* et *protoSS1*, eux-mêmes placés en tandem, est renforcée par des études de synténie montrant que plusieurs autres gènes, *MASP2*, *CLCN6* et *TP73* de la région 1p36 possèdent un parologue dans la région 3q28, *i.e.* *MASPI*, *CLCN2* et *TP73L*, respectivement (Tostivint *et al.*, 2006) (Figure 12). De fait, les régions 1p36 et 3q28 sont considérées comme des paralogons, *i.e.* des régions ayant subi des duplications à grande échelle (Popovici *et al.*, 2001).

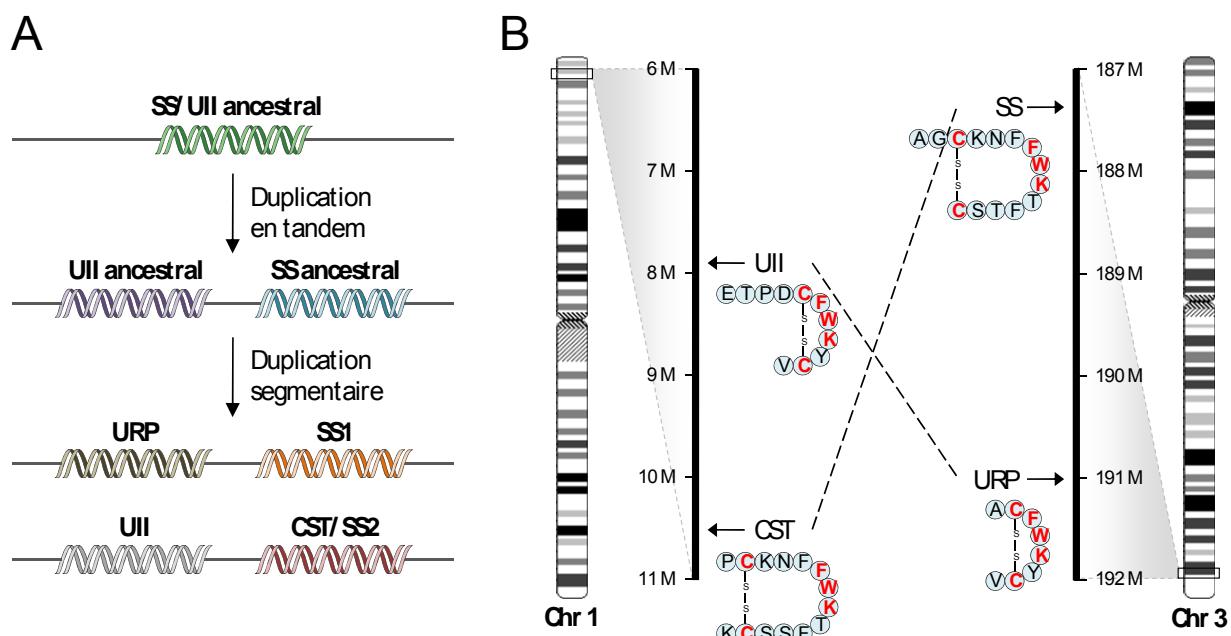


Figure 12 : Evolution des gènes des familles de peptides urotensinergiques et somatostatinergiques. A. Processus évolutifs à l'origine des gènes des familles de l'UII et de la somatostatine (SS). Un ancêtre commun aux deux familles aurait d'abord subit une duplication en tandem, suivie d'une duplication segmentaire (coïncidant vraisemblablement avec l'une des deux duplications du génome entier) à l'origine des séquences codant l'UII, l'URP, la SS1 et la cortistatine (CST ou SS2). B. Localisation chromosomique des gènes codant l'UII et la CST (1p36) et des gènes codant la SS et l'URP (3q28) chez l'Homme. Les positions relatives sont exprimées en Mega (M) bases et les pointillés relient 2 peptides apparentés. La structure secondaire de chaque peptide est représentée ; les résidus conservés au sein des deux familles sont indiqués en rouge. (D'après Tostivint *et al.*, 2006).

1.2. Structures de l'UII, de l'URP et de leur précurseur

Selon les espèces, l'UII est constituée d'un nombre variable d'acides aminés, compris entre 11 chez l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998) et 17 chez la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999) (Figure 13). Jusqu'à présent, la caractérisation de la séquence de l'URP se limite à l'Homme, la Souris, le Rat (Sugo *et al.*, 2003) et le Poulet (Tostivint *et al.*, 2006). Sa séquence est strictement conservée chez les Mammifères et correspond à l'Ala¹-UII₄₋₁₁ humaine (Sugo *et al.*, 2003). Chez le Poulet, seule la valine en position 8 est substituée par une isoleucine (Figure 13) (Tostivint *et al.*, 2006).

Les formes matures de l'UII et de l'URP possèdent dans leur région C_{term} une séquence cyclique de 6 acides aminés (CFWKYC) strictement conservée des poissons jusqu'aux Mammifères (Douglas *et al.*, 2004). La triade FWK (Figure 13), également présente dans la partie cyclique de la SS1 et de la CST, est indispensable à l'activité biologique. En effet, la substitution d'un des acides aminés de cette triade par son énanthiomère de la série D ou par tout autre résidu, génère des analogues inactifs de l'UII (Camarda *et al.*, 2002b ; Flohr *et al.*, 2002 ; Kinney *et al.*, 2002 ; Labarrère *et al.*, 2003 ; Guerrini *et al.*, 2005) et de l'URP (Chatenet *et al.*, 2004). La présence d'un coude γ -inversé, mis en évidence par résonance magnétique nucléaire (RMN) dans la structure de l'URP, serait indispensable à la liaison des peptides sur leur récepteur (Chatenet *et al.*, 2004).

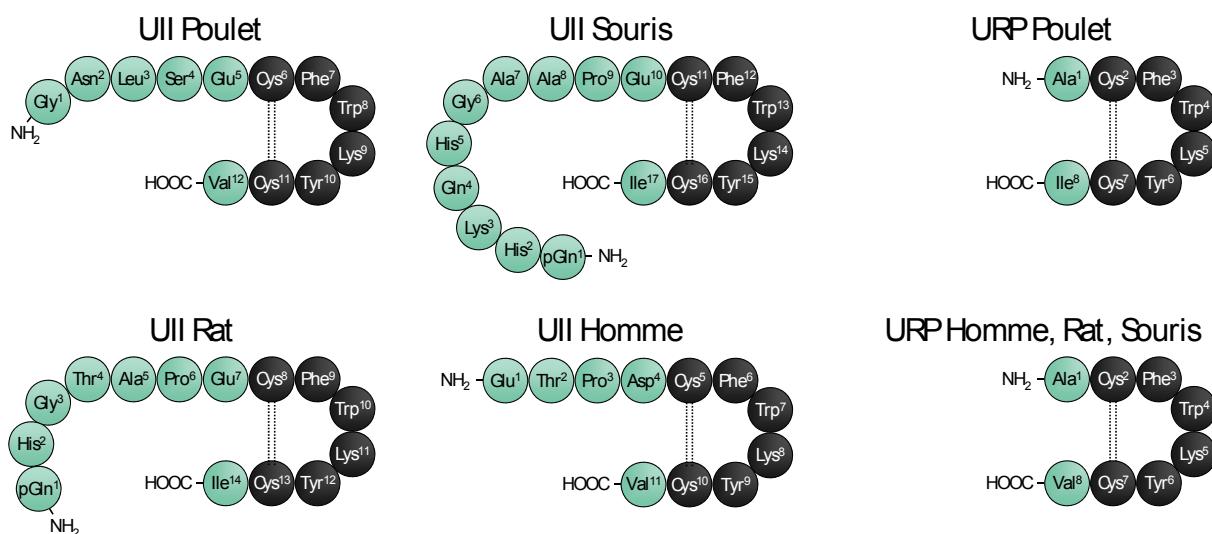


Figure 13 : Représentation schématique de l'UII et de son paralogue URP chez l'Homme, le Rat, la Souris et le Poulet. pGln, pyroglutamine.

A

Singe	Porc	Souris	Rat	Poulet	Grenouille	Carpe α	Carpe β	P. zèbre α	P. zèbre β	
92	61	50	50	47	30	19	21	21	25	Homme
	60	52	52	41	30	9	17	20	26	Singe
		47	43	37	29	23	23	24	10	Porc
			84	39	20	22	26	14	21	Souris
				39	28	22	26	21	22	Rat
					41	23	23	24	35	Poulet
Rat	29					14	23	19	19	Grenouille
Souris	33	76					89	75	40	Carpe α
Homme	40	55	50					73	40	Carpe β
Poulet		Rat	Souris						37	P. zèbre α

B

Tableau 5 : Pourcentages d'identité entre les séquences peptidiques de la préproUII (A) et du préproURP (B). Les formes α et β identifiées chez la Carpe et le Poisson zèbre (P. zèbre) correspondent à des variants (*D'après le logiciel ClustalW*).

Contrairement à la région C_{term}, la portion N_{term} est très variable d'une espèce à l'autre, tant sur le nombre que sur la nature des résidus. A titre d'exemple, l'UII de Souris contient 10 acides aminés en amont du cycle, contre 5 et 4 résidus chez le Rat et l'Homme, respectivement (Figure 13) (Coulouarn *et al.*, 1998, 1999).

La proUII (Coulouarn *et al.*, 1998) et le proURP (Sugo *et al.*, 2003) sont des précurseurs monofonctionnels, *i.e.* ils possèdent une seule copie du peptide actif situé dans la région C_{term}. Comme la quasi-totalité des précurseurs neuropeptidiques, la préproUII et le préproURP sont flanqués en position N_{term} d'un peptide signal d'une vingtaine de résidus. Contrairement aux séquences de l'UII et de l'URP qui sont très conservées, celles de leur précurseur sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre (Tableau 5). En effet, la préproUII humaine ne partage que 50% et 61% d'identité avec ses homologues murin (Coulouarn *et al.*, 1999) et porcin (Mori *et al.*, 1999). De plus, chez la Souris et le Rat, deux espèces pourtant proches phylogénétiquement, les précurseurs présentent seulement 84% d'identité entre eux (Tableau 5A) (Coulouarn *et al.*, 1999). De même, le préproURP humain ne partage que 40% à 55% d'identité avec les précurseurs de Rat, de Souris et de Poulet (Tableau 5B) (Tostivint *et al.*, 2006) (*d'après le logiciel ClustalW sur le site <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>*).

1.3. Localisations périphérique et centrale de l'UII et de l'URP

1.3.1. Localisation périphérique

L'UII et l'URP sont largement distribués en périphérie, particulièrement dans les systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Tableau 6). Dans le cœur, les ARNm et les peptides sont présents dans les oreillettes et les ventricules chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2001 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Dschietzig *et al.*, 2002 ; Douglas *et al.*, 2002 ; Tzanidis *et al.*, 2003 ; Maguire *et al.*, 2004) et le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002). L'UII est également détectée dans le cœur de Rat (Ames *et al.*, 1999 ; Sugo *et al.*, 2003) et de Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002).

Au niveau vasculaire, le réseau artériel présente des niveaux élevés d'ARNm codant l'UII, notamment dans l'aorte thoracique, les artères pulmonaires et les artéries (Matsushita *et al.*, 2001 ; Dietschzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004). En revanche, à l'exception des veines saphènes et ombilicales, le réseau veineux n'exprime pas le peptide (Matsushita *et al.*, 2001 ; Dschietzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004). Dans tous ces tissus, l'UII est localisée à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (Douglas *et al.*, 2002). Plusieurs études ont montré la présence de quantités significatives d'UII circulante chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2001 ; Richards *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2002 ; Russell *et al.*, 2003). L'existence d'une protéase plasmatique capable de générer l'UII à partir de son précurseur (Russell *et al.*, 2004), suggère que l'UII circulante serait le résultat d'une maturation extracellulaire. Des expériences de spectrométrie de masse ont pu montrer l'existence d'une *urotensin-converting enzyme* (UCE) d'abord à partir de tissu rénal de Porc (Schlüter *et al.*, 2003) puis dans des cellules endothéliales humaines (Russel *et al.*, 2004). Même si la démonstration du clivage protéolytique de l'UII humaine dans ces cellules révèle une activité de l'UCE de type furine, l'enzyme n'est à ce jour toujours pas caractérisée (Russell *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux tendent à montrer que les reins constituent un site majeur de production d'UII chez l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Nothacker *et al.*, 1999 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003 ; Sugo *et al.*, 2003). Le peptide est particulièrement

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système Nerveux Central				
Cerveau	1, 27	11		11
Hypothalamus				9
Tronc cérébral	1, 3, 17, 25, 27		4, 8	10
Moelle épinière	1, 3, 25	1, 11	4, 8, 14, 25, 25	4, 10, 19, 19
Cervelet	25, 27	11		4
Liquide céphalorachidien	5, 26			
Système Cardiovasculaire				
Cœur	1, 27, 28	1, 4, 25	1, 4, 25	4, 11
<i>Myocarde</i>	6		4, 8	
<i>Oreillettes</i>	6, 7, 13, 15, 27, 28	11	4, 8, 25	
<i>Ventricules</i>	6, 7, 14, 27, 28, 29	11		
<i>Auricule droit</i>	15			
Aorte thoracique	15	1, 11	14	11
Artère mammaire	7			
Veine saphène	7, 12, 15			4
Plasma	17, 20, 21, 22, 27			
Système Endocrinien				
Hypophyse	3, 27	25	25	4
Panréas	3, 27	3	3	4
Surrénale	3, 27	3	3	4
Testicule	25	25	25, 25	4
Ovaire	25			4
Placenta	25			4
Systèmes Urogénital et Gastrointestinal				
Rein	2, 13, 15, 17, 18, 25, 27, 28	11	4, 14, 16, 25	4, 11
<i>Tube contourné</i>	13, 23		16	
<i>Glomérule</i>	13, 23		16	
<i>Tube collecteur</i>	13, 23			
Vessie	2	11	25	11
Prostate	2, 25		25	
Œsophage		11	25	11
Estomac	3, 25	11, 25	25	
Vésicule biliaire				
Intestin	3, 25, 27, 25	11, 25	25	4, 11
Foie	3, 13, 25, 28, 25	11, 25	4, 25	11
Autres tissus				
Thymus	3, 25, 25		25, 25	4
Rate	3, 25	11, 25	4, 25, 25	4, 11
Poumon	13, 25, 25	11, 25	4, 25	4, 11
Muscle squelettique	25	11	14, 25	11

abondant dans les cellules épithéliales des glomérules, des tubes contournés et des tubes collecteurs rénaux (Shenouda *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004). Toutefois, l'expression de l'UII dans le rein est très faible chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002) voire inexistante chez le Rat (Sugo *et al.*, 2003).

L'UII est exprimée dans plusieurs glandes endocrines chez l'Homme et le Rat, en particulier dans l'hypophyse, le pancréas et la glande surrénale (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Sugo *et al.*, 2003). Le préproURP est quant à lui essentiellement présent dans le testicule, ainsi que dans l'ovaire et le placenta chez l'Homme (Sugo *et al.*, 2003). Les niveaux d'expression observés chez le Rat sont significatifs dans l'hypophyse, le pancréas et la surrénale pour l'UII, et dans le testicule pour l'URP (Sugo *et al.*, 2003). En revanche, les ARNm codant l'UII sont indétectables dans les glandes endocrines chez le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). La distribution de l'UII et l'URP s'étend à d'autres tissus comme la rate, le thymus, le foie, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le poumon (Coulouarn *et al.*, 1998, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Sugo *et al.*, 2003 ; Maguire *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données montre que l'UII et l'URP sont largement distribués en périphérie, mais qu'il existe une grande variabilité inter-espèces, même pour des espèces phylogénétiquement proches.

1.3.2. Localisation dans le système nerveux central

Dès les années 80, la présence de l'UII et de son précurseur a été mise en évidence dans le SNC de poissons téléostéens, au niveau de la moelle épinière pour le Gobie (Bern *et al.*,

⇒ **Tableau 6 : Localisation de l'UII et de l'URP chez les Mammifères.** Ce tableau a été réalisé à partir de données obtenues par RT-PCR, RT-PCR quantitative, hybridation *in situ*, dot-blot, southern blot, northern blot, immunohistochimie ou dosage radioimmunologique. La localisation de l'UII et de l'URP est représentée en noir et en rouge, respectivement. La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Ames *et al.*, 1999 ; **2**, Chartrel *et al.*, 2004 ; **3**, Coulouarn *et al.*, 1998 ; **4**, Coulouarn *et al.*, 1999 ; **5**, Cowley *et al.*, 2005 ; **6**, Douglas *et al.*, 2002 ; **7**, Dschietzig *et al.*, 2002 ; **8**, Dun *et al.*, 2001 ; **9**, Egginger et Calas, 2005 ; **10**, Egginger *et al.*, 2006 ; **11**, Elshourbagy *et al.*, 2002 ; **12**, Leifeld *et al.*, 2009 ; **13**, Maguire *et al.*, 2000 ; **14**, Maguire *et al.*, 2008 ; **15**, Matsushita *et al.*, 2001 ; **16**, Mori *et al.*, 2009 ; **17**, Ng *et al.*, 2002 ; **18**, Nothacker *et al.*, 1999 ; **19**, Pelletier *et al.*, 2005 ; **20**, Richards *et al.*, 2002 ; **21**, Russell *et al.*, 2003 ; **22**, Russell *et al.*, 2004 ; **23**, Shenouda *et al.*, 2002 ; **24**, Silvestre *et al.*, 2004 ; **25**, Sugo *et al.*, 2003 ; **26**, Thompson *et al.*, 2003 ; **27**, Totsune *et al.*, 2001 ; **28**, Totsune *et al.*, 2003 ; **29**, Tzanidis *et al.*, 2003.

1985) et du tronc cérébral pour le Meunier (Yulis and Lederis, 1986). C'est également dans ces régions que des taux élevés d'UII sont retrouvés chez des espèces dites supérieures, *i.e.* la Grenouille (Chartrel *et al.*, 1996 ; Conlon *et al.*, 1996 ; Coulouarn *et al.*, 1998) et les Mammifères (Tableau 6) (Coulouarn *et al.*, 1998, 1999 ; Dun *et al.*, 2001). Plus précisément, le gène codant l'UII est essentiellement exprimé dans des motoneurones des noyaux des nerfs crâniens abducens, facial, trijumeau et hypoglosse chez le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Dun *et al.*, 2001) et ceux de la partie caudale de la moelle épinière chez la Souris (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Egginger *et al.*, 2006 ; Dubessy *et al.*, 2008), le Rat (Coulouarn *et al.*, 1999) et l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Ames *et al.*, 1999 ; Chartrel *et al.*, 2004). De façon inattendue, l'UII n'est pas présente dans le tronc cérébral de Singe (Ames *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002) indiquant qu'il existe des variations d'expression inter-espèces importantes. Même si les concentrations sont relativement faibles, l'UII est également retrouvée dans le liquide céphalorachidien chez l'Homme (Thompson *et al.*, 2003 ; Cowley *et al.*, 2005).

Bien que l'URP ait été caractérisé en 2003 (Sugo *et al.*, 2003), sa distribution dans le cerveau demeure mal connue. Les données disponibles à ce jour indiquent que les ARNm codant l'URP sont localisés dans la moelle épinière chez l'Homme et le Rat, avec des niveaux d'expression largement inférieurs à ceux de l'UII (Sugo *et al.*, 2003). Chez la Souris, les précurseurs des deux peptides sont co-localisés dans les motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière (Pelletier *et al.*, 2005 ; Dubessy *et al.*, 2008). Des composés immunologiquement apparentés à l'URP seraient présents dans les somas neuronaux de l'aire préoptique et au niveau des fibres de l'organe vasculaire de la lame terminale et de l'éminence médiane (Egginger and Calas, 2005).

2. Le récepteur de l'urotensine II ou UT

2.1. Caractérisation de l'UT

Chez les Mammifères, tous les récepteurs peptidergiques identifiés à ce jour appartiennent à la superfamille des RCPG, dont les membres partagent des caractéristiques

structurales, *i.e.* la présence de 7 DTM, une séquence N_{term} extracellulaire et une séquence C_{term} intracellulaire (Probst *et al.*, 1992).

Par des approches différentes, deux équipes de recherche ont isolé l'ADNc codant un récepteur orphelin nommé GPR14. La première approche s'appuyait sur les caractéristiques structurales communes à tous les RCPG et sur des banques de données génomiques (Marchese *et al.*, 1995), et la seconde approche sur les mécanismes de transduction des signaux sensoriels tels que les odeurs, la lumière et le goût, relayés par des RCPG (Tal *et al.*, 1995). Initialement identifié à partir de tissus sensoriels de Rat, le GPR14 a été renommé *sensory epithelium neuropeptide-like-receptor* ou SENR (Tal *et al.*, 1995), puis définitivement rebaptisé UT (Douglas and Ohlstein, 2000). L'UT partage des analogies structurales avec les récepteurs somatostatnergiques (SSTR) et opioïdnergiques (OR), mais également avec les récepteurs de la MCH (*melanin-concentrating hormone*) et de la galanine et les GPR7 et 8. La comparaison de la séquence de l'UT et de SSTR4 révèle 27% d'analogie de structure sur l'ensemble des acides aminés, et 41% d'identité si l'on prend uniquement en compte les DTM (Marchese *et al.*, 1995). De la même manière, l'analyse des séquences complètes ou des DTM des récepteurs opioïdnergiques et de l'UT révèle respectivement 25% et 34% d'identité avec le récepteur κOR, et 26% et 34% avec les récepteurs δOR et μOR (Marchese *et al.*, 1995).

La stratégie de pharmacologie inverse consiste à tester une série de ligands potentiels pour leur capacité à stimuler une activité biologique associée à un récepteur d'intérêt (Stadel *et al.*, 1997). Après transfection des formes humaine et murine de l'UT dans la lignée HEK293, Ames *et al.* (1999) ont testé plus de 700 composés parmi lesquels l'UII de Gobie, qui s'est révélée être un puissant agoniste du récepteur (Ames *et al.*, 1999). La même année, à l'aide de différents modèles biologiques, trois autres équipes ont confirmé que l'UII est un ligand naturel de l'UT (Liu *et al.*, 1999 ; Mori *et al.*, 1999 ; Nothacker *et al.*, 1999). Compte tenu des analogies structurales de l'UII avec d'autres peptides cycliques (SS1 et CST), la spécificité du couple UII/UT pouvait être sujette à controverse. Cependant, seules des concentrations très élevées de SS1 et de CST sont capables d'activer l'UT (Liu *et al.*, 1999 ;

Nothacker *et al.*, 1999), permettant ainsi de confirmer que l'UTI est le ligand endogène de l'UT. Les formes de récepteur UT humain (Maguire *et al.*, 2000), de Macaque (Elshourbagy *et al.*, 2002), de Rat (Marchese *et al.*, 1995 ; Tal *et al.*, 1995), de Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002) et de Chat (Aiyar *et al.*, 2005) présentent respectivement 95%, 74%, 74% et 74% d'identité entre elles (*d'après le logiciel ClustalW*).

2.2. Structure et pharmacologie de l'UT

2.2.1. Structure

Chez l'Homme, le gène codant l'UT est localisé sur le chromosome 17 (17q25.3) (Protopopov *et al.*, 2000) (*Genbank, n° d'accésion Q9UKP6*) et ne présente pas d'intron

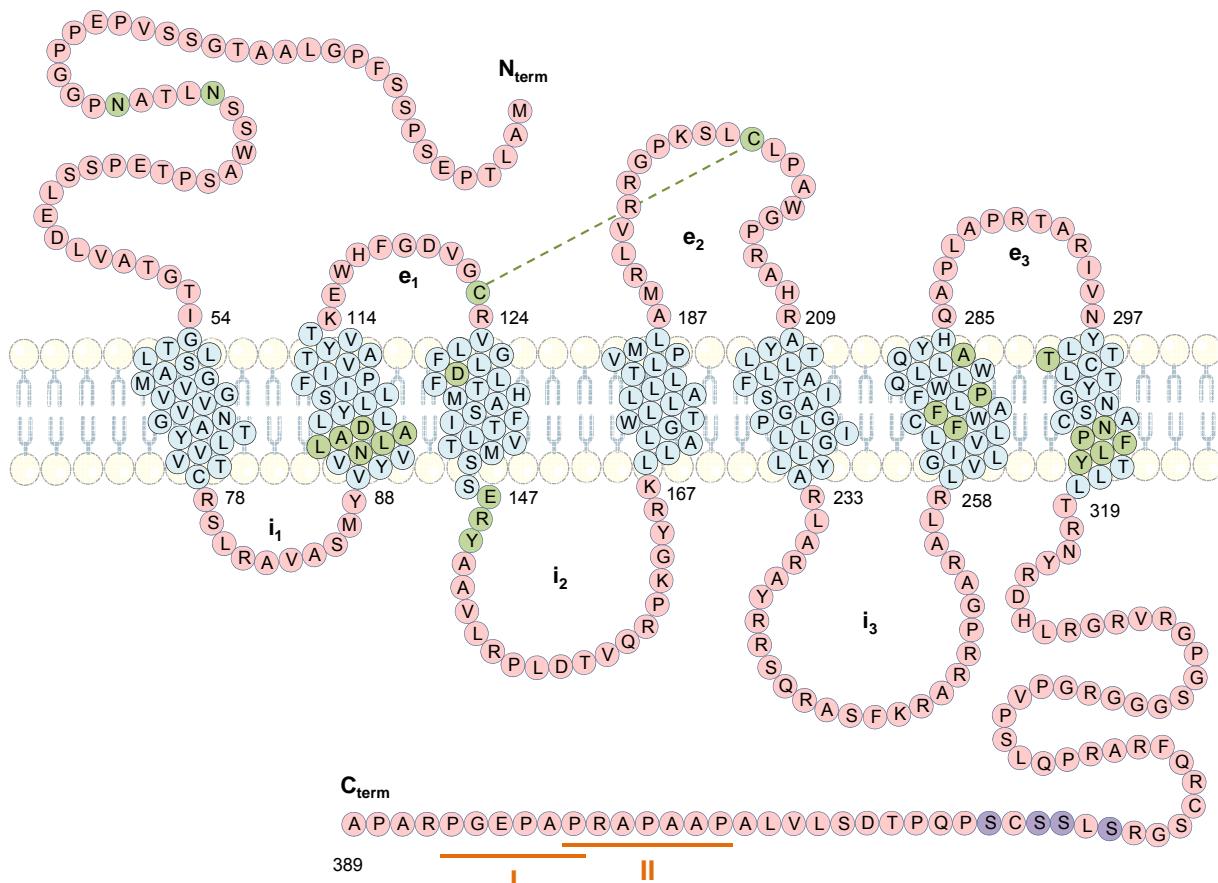


Figure 14 : Structure du récepteur UT humain. Représentation schématique des DTM, des boucles extracellulaires (e_{1-3}) et intracellulaires (i_{1-3}) de l'UT humain. Les résidus colorés en vert représentent les séquences consensus des RCPG de classe A : 2 sites potentiels de N-glycosylation dans le segment N_{term} , un motif NLxxxD au sein du DTM2, un pont disulfure présent entre les résidus Cys¹²³ et Cys¹⁹⁹ (représenté par la ligne discontinue), le résidu asparagine 130 conservé, un motif ERY dans la boucle i_2 , 5 résidus conservés dans les DTM 6 et 7 et un motif NPxxY dans le DTM7. Dans sa partie C_{term} , l'UT humain présente 2 motifs poly-proline de type I et II (orange) ainsi qu'un cluster de résidus sérine (violet). (*Adapté d'après Onan *et al.*, 2004*).

dans sa partie codante. Le récepteur UT appartient aux RCPG de classe A, avec lesquels il partage de nombreuses homologies de structure. L'UT possède deux sites de N-glycosylation dans la région N_{term}, un motif NLxxxD dans le DTM2 (où x représente n'importe quel acide aminé), un pont disulfure entre les boucles extracellulaires e₁ et e₂, une séquence E/DRY à la jonction du DTM3 et de la boucle i₂, un site de palmitoylation (Cys), un motif NPxxY dans le DTM7, des sites potentiels de phosphorylation par des protéines kinases A et C, la *casein kinase 1* et la *glycogen synthase kinase 3* au niveau des boucles intracellulaires i₂ et i₃ et dans le domaine C_{term}, et deux motifs poly-proline de type I et II au niveau de la séquence C_{term} (Figure 14) (Tal *et al.*, 1995 ; Marchese *et al.*, 1995). A l'heure actuelle, aucun sous-type de récepteur n'a été identifié ; seuls plusieurs polymorphismes ont été décrits (Protopopov *et al.*, 2000 ; Iida and Nakamura, 2005 ; Sjoebloem *et al.*, 2006 ; Bentley *et al.*, 2008), parmi lesquels la substitution de l'Arg¹⁴⁸ du motif ERY par un résidu His (réf SNP, ID rs13305975). Une telle mutation a déjà été décrite pour le récepteur V₂ de la vasopressine, conduisant à une désensibilisation constitutive (Barak *et al.*, 2001).

Des études réalisées sur des segments synthétiques de l'UT, ont démontré que seules les boucles e₂ et e₃ du récepteur adoptent une conformation en hélice α capable d'interagir avec l'UII et l'URP (Boivin *et al.*, 2006, 2008). Plus récemment, Lescot *et al.* (2008) ont généré un modèle tridimensionnel de l'UT humain à partir duquel ils ont démontré que la liaison de l'UII humaine sur son récepteur met en jeu les DTM 3, 4, 6 et 7, en plus des boucles e₂ et e₃. Ce modèle a notamment permis de calculer un volume de la poche de liaison de 1162 A°³ lorsque l'UT est inactif et de 1814 A°³ après liaison de l'UII (Figure 15) (Lescot *et al.*, 2008). L'équipe de Leduc avaient auparavant démontré, à l'aide de la technique de marquage par photoaffinité, une implication des résidus Met²⁸⁸ du DTM3 et Met¹⁸⁵ et/ou Met¹⁸⁴ du DTM4 de l'UT de Rat (Figure 15) (Boucard *et al.*, 2003, Holleran *et al.*, 2007). Plus récemment, la méthode SCAM a permis l'identification des acides aminés Phe²⁶⁸, Trp²⁷⁸ et Leu²⁸² du DTM6 et Leu²⁹⁸, Tyr³⁰⁰, Thr³⁰² et Thr³⁰³ du DTM7, impliqués dans la liaison de l'UII sur l'UT humain (Holleran *et al.*, 2009).

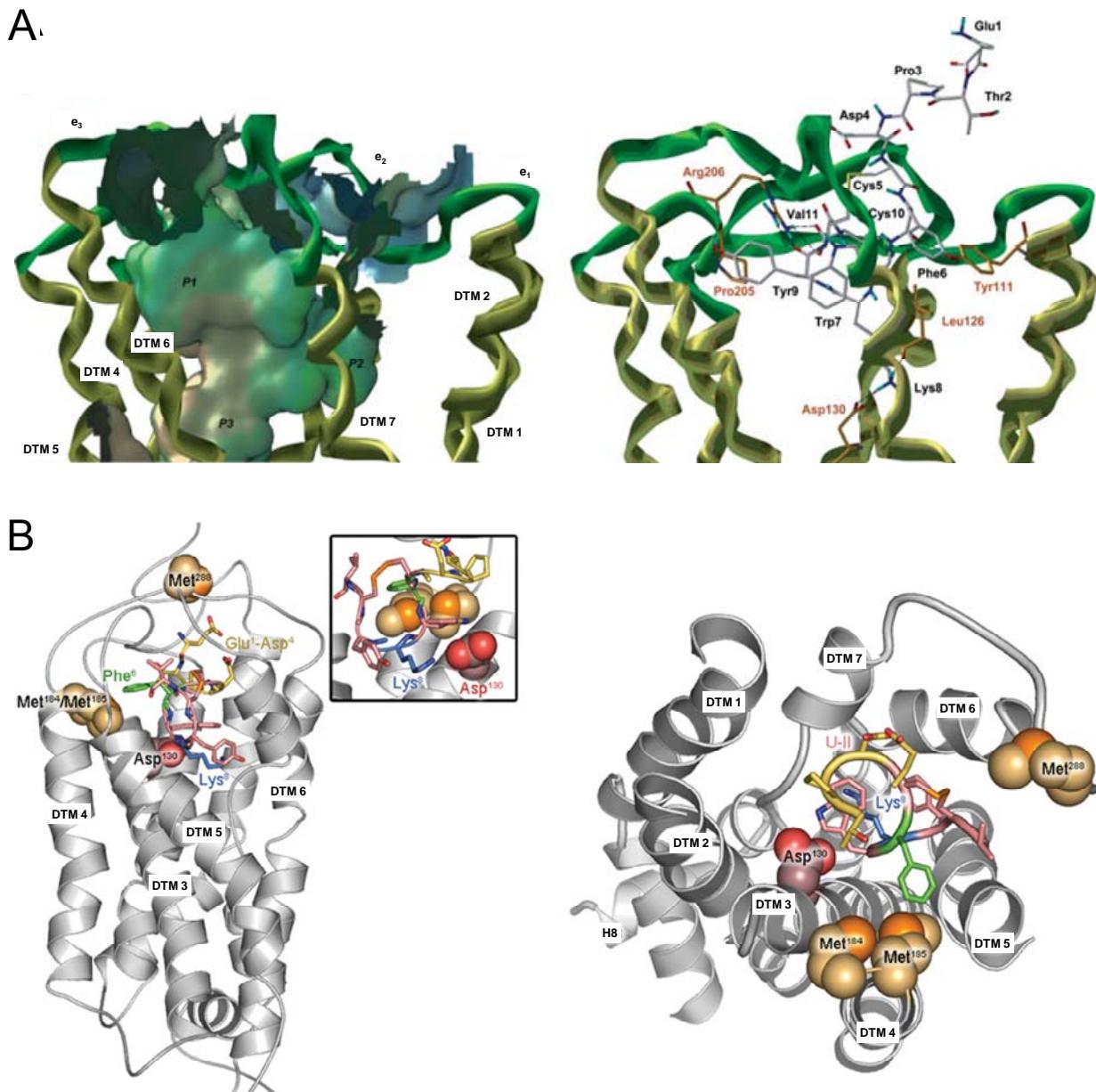


Figure 15 : Modélisation moléculaire de la liaison de l'UII sur le récepteur UT. **A.** Représentation tridimensionnelle de la poche de liaison de l'UII sur l'UT humain en configuration active. *Gauche*, Le site de liaison de l'UII est constitué de 3 poches de liaison, nommées P1, P2 et P3. La coloration est fonction du degré de lipophilie et s'étale du marron (le plus lipophile) au bleu (le plus hydrophile). *Droite*, Les résidus de l'UT impliqués dans la liaison de l'UII sont en orange. Les boucles extracellulaires et les DTM sont en vert et en jaune, respectivement. (*D'après Lescot et al., 2008*). **B.** Modélisation de l'UT de Rat dans sa configuration inactive mais complexée à l'UII, observé d'un point de vue latérale (*gauche*) ou de dessus (*droite*). L'UII apparaît en rose, excepté pour les résidus Glu¹ à Asp⁴ colorés en jaune, Phe⁶ en vert et Lys⁸ en bleu qui interagissent respectivement avec les résidus Met²⁸⁸, Met¹⁸⁴/Met¹⁸⁵ (les résidus méthionine sont en orange) et Asp¹³⁰ (rouge) de l'UT. L'encadré représente l'interaction de la Lys⁸ de l'UII avec l'Asp¹³⁰ de l'UT vue depuis le DTM6. (*D'après Holleran et al., 2007*).

La comparaison des séquences de l'UT humain et murin met en évidence d'importantes différences dans la boucle C_{term}. En effet, seul le récepteur humain possède deux sites polyprolines de type I et II qui permet d'interagir avec des protéines intracellulaires à domaines de type SH3 (*d'après le site www.scansit.mit.edu/motifscan*). L'ensemble de ces données implique une extrême prudence dans la transposition de résultats de l'animal à l'Homme.

2.2.2. Pharmacologie

Les propriétés vasoactives de l'UII observées dès les années 80 sur des anneaux d'aortes de Rat (Gibson, 1987), ont naturellement conduit plusieurs groupes à développer des analogues de l'UII et de l'URP à visée thérapeutique dans le traitement de pathologies du système cardiovasculaire. Les premiers travaux ont consisté à étudier les relations structure/activité des peptides. La délétion des résidus N_{term} de l'UII humaine a révélé que l'UII₍₄₋₁₁₎ correspond à la séquence minimale recouvrant la pleine activité biologique, alors que l'UII₍₅₋₁₁₎ est selon les études, 200 à 1000 fois moins efficace que le peptide natif (Perkins *et al.*, 1990 ; Flohr *et al.*, 2002 ; Labarrère *et al.*, 2003). Le remplacement de chacun des trois résidus N_{term} par une alanine (Ala-scan) ou par son énantiomère dextrogyre (D-scan) est sans conséquence sur l'activité biologique (Flohr *et al.*, 2002 ; Kinney *et al.*, 2002 ; Brkovic *et al.*, 2003 ; Labarrère *et al.*, 2003). Bien que l'[Ala¹¹]UII et la [D-Val¹¹]UII conservent des propriétés vasoactives modérées, le premier est deux fois plus puissant que le second, révélant que l'orientation de la chaîne latérale du résidu C_{term} est essentielle pour l'activité biologique (Labarrère *et al.*, 2003). L'importance du résidu C_{term} a récemment été confirmée par Lescot *et al.* (2008) qui, grâce au modèle 3D de l'UT humain, ont mis en évidence l'existence de 3 liaisons hydrophobes entre la Val¹¹ de l'UII et le résidu Arg²⁰⁶ de l'UT (Figure 15).

Toute modification de la portion cyclique perturbe considérablement l'efficacité du couplage ligand/récepteur. En effet, le remplacement par une alanine ou leur énantiomère dextrogyre de Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ ou Tyr⁹ pour l'UII humaine et de Phe³, Lys⁵ et Tyr⁶ pour l'URP, génère des analogues inactifs dans le modèle de contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Labarrère *et al.*, 2003 ; Chatenet *et al.*, 2004). De plus, la réduction de la taille du cycle

contrarie la liaison de l'UII sur l'UT (Kinney *et al.*, 2002). La présence des résidus Cys, responsables de la formation d'un pont disulfure, est également indispensable puisque leur remplacement par deux résidus sérine dans la séquence de l'UII humaine (Labarrère *et al.*, 2003 ; Guerrini *et al.*, 2005) ou par leur énanthiomère dextrogyre dans celle de l'URP (Chatenet *et al.*, 2004) diminue fortement l'activité vasoactive. De façon intéressante, l'analogue cyclique [Pen^{5,10}]UII, qui correspond à la substitution des résidus cystéine par une pénicillamine (résidu présentant deux groupements méthyle supplémentaires), est 8 fois moins puissant que l'UII sur le test de contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Labarrère *et al.*, 2003). En revanche, la substitution du seul acide aminé Cys⁵ par une pénicillamine sur l'UII₍₄₋₁₁₎ aboutit à un super agoniste, dénommé P5U, 3 fois plus affin et 20 fois plus puissant que l'UII sur le test de contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Grieco *et al.*, 2002 ; Patacchini *et al.*, 2003). Les études de structure-activité de Labarrère *et al.* (2003) ont également permis de caractériser un super agoniste de l'UT, le [3-iodo-Tyr⁶]UII₍₄₋₁₁₎, 5 fois plus puissant que l'UII (Labarrère *et al.*, 2003).

La substitution par une ornithine de la Lys⁸ pour l'UII humaine et Lys⁵ pour l'URP a permis de générer les premiers antagonistes peptidiques de l'UT. L'[Orn⁸]UII se comporte comme un véritable antagoniste compétitif sur la contraction d'anneaux d'aortes de Rat (Camarda *et al.*, 2002a, b ; Vergura *et al.*, 2004), tandis que l'[Orn⁵]URP, qui présente pourtant des propriétés antagonistes sur l'UT de Rat (Diallo *et al.*, 2008), conserve une faible activité agoniste sur l'UT humain (Chatenet *et al.*, 2004). Ces résultats ont ensuite permis d'élaborer d'autres composés tels que l'urantide ([Pen⁵, D-Trp⁷, Orn⁸]UII₍₄₋₁₁₎), un antagoniste totalement dépourvu d'activité intrinsèque sur le modèle d'anneaux d'aortes de Rat (Patacchini *et al.*, 2003 ; Camarda *et al.*, 2004). Cependant, dans la mesure où ce composé mime les effets stimulants de l'UII humaine sur la $[Ca^{2+}]_c$ dans des cellules CHO transfectées par l'ADNc codant l'UT humain (Camarda *et al.*, 2004), il se pourrait que les différences structurales de l'UT entre espèces (cf § 2.2.1.) expliquent l'absence d'utilisation potentielle de ces antagonistes peptidiques dans des essais cliniques chez l'Homme.

Au cours de ces dernières années, d'autres antagonistes, de nature non-peptidique, ont également été développés (Behm *et al.*, 2004b ; Douglas *et al.*, 2005 ; Cosenzi, 2008 ; Lescot *et al.*, 2008). Les premiers composés, dérivés de pyrrolidine, ont été décrits par la Société GlaxoSmithKline (Dhanak *et al.*, 2001a, b ; Jin *et al.*, 2005), et ont servi de base aux dérivés sulfonamide suivants, tels que le SB-611812 et le SB-706375 (Dhanak *et al.*, 2001, 2002a-g ; Barton *et al.*, 2004 ; Douglas *et al.*, 2005 ; Boussette *et al.*, 2006a, b). Parmi les plus puissants antagonistes connus à ce jour figurent des dérivés de l'urée tels que le palosuran développé par la Société Actélion (Aissaoui *et al.*, 2002, 2004a, b ; Clozel *et al.*, 2004 ; Mathys *et al.*, 2005 ; IC₅₀ = 67 nM sur l'UT humain), des dérivés des benzazépines (Tarui *et al.*, 2002 ; IC₅₀ = 1,7 nM), des dérivés diphényle carboxamide (Tarui *et al.*, 2001 ; IC₅₀ = 6 nM) et des dérivés de la quinoléine développés par *Takeda Chemical Industries* (Tarui *et al.*, 2001 ; IC₅₀ = 2,4 nM). Le palosuran a été le premier antagoniste de l'UT testé chez l'Homme. Les premières études menées chez des rats présentant une insuffisance rénale aigüe ischémique montrent que le palosuran entraîne une augmentation significative de la fonction rénale, et diminue le nombre de lésions tubulaires et tubulo-interstitielles. Administré chez des patients diabétiques présentant une macroalbuminurie, ce composé diminue l'albuminurie sans perturber les paramètres hémodynamiques rénaux ou systémiques (Sidharta *et al.*, 2006). Cependant, des études complémentaires n'ont pas confirmé ces résultats. Très récemment, des travaux menés par cette équipe chez des patients atteints de diabète de type 2 rapportent que le palosuran (2 fois 125 mg par jour pendant 4 semaines) ne modifie ni la sécrétion d'insuline ni le taux de glucose sanguin, sans altérer les paramètres hémodynamiques (Sidharta *et al.*, 2009).

La recherche de nouveaux agonistes et antagonistes de l'UT s'appuie également sur des modélisations tridimensionnelles de l'UT et de ses ligands afin de réaliser des criblages virtuels des librairies de composés. Flohr *et al.* (2002), par une approche de résonnance magnétique nucléaire, ont été les premiers à proposer un modèle de pharmacophore, basé sur la séquence Trp-Lys-Tyr de l'UII, à partir duquel une dizaine d'antagonistes non peptidiques ont été obtenus par criblage virtuel. Plusieurs équipes ont par la suite complété ce modèle

(Carotenuto *et al.*, 2004 ; Kobilka, 2005), et notamment Lescot *et al.* (2007) qui ont proposé 2 modèles de pharmacophores pour des antagonistes non peptidiques de l'UT, basé à la fois sur l'UII humaine et sur 4 antagonistes non peptidiques de l'UT : un dérivé de l'urée, un dérivé des benzazépines, un dérivé diphényle carboxamide et un dérivé de la quinoléine. Le criblage virtuel de leur librairie interne a permis d'isoler 231 composés, parmi lesquels 6 présentent une activité antagoniste de l'UT sur un test de mobilisation calcique (IC_{50} compris entre 1,4 et 6,36 μM). Parallèlement, une autre approche a consisté en la modélisation 3D de l'UT afin d'étudier et de comparer la liaison d'agonistes et d'antagonistes peptidiques ou non-peptidiques pour la réalisation de criblages *in silico* (Kinney *et al.*, 2002 ; Lavecchia *et al.*, 2005 ; Lescot *et al.*, 2008 ; Grieco *et al.*, 2009). Les récepteurs de Rat et humain ont ainsi été étudiés, permettant *i*) d'identifier les résidus de l'UT impliqués dans la liaison de l'UII, et *ii*) de mettre en évidence les sites impliqués dans la reconnaissance d'un agoniste ou d'un antagoniste.

2.3. Désensibilisation et internalisation de l'UT

Très peu d'études, parfois contradictoires, ont à ce jour été réalisées sur la désensibilisation de l'UT, notamment en raison de la liaison quasi irréversible de l'UII sur son récepteur et de l'absence de bons agonistes réversibles (Douglas *et al.*, 2000 ; Qi *et al.*, 2005 ; Song *et al.*, 2006). Les premières données obtenues par Camarda *et al.* (2002) rapportent qu'au cours de deux applications consécutives d'UII sur le même anneau d'aorte thoracique de Rat à 5 heures d'intervalle, la réponse contractile induite par la seconde application est diminuée d'environ 50%. Des résultats obtenus plus récemment par un test de mobilisation calcique en utilisant des cultures de cellules endothéliales aortiques humaines décrivent également une réponse diminuée de 50% lors d'une seconde application d'UII 100 nM à 10 minutes d'intervalle (Brailoiu *et al.*, 2008). Toutefois, l'équipe de Filipeanu a montré sur des cultures de neurones de moelle épinière que deux applications d'UII (1 μM) espacées de 10-15 min entraînent une réponse calcique de même amplitude (Filipeanu *et al.*, 2002). Plus tard, deux équipes ont démontré que l'application d'UII sur des cellules COS-7 (0,2 nM ; Proulx *et*

al., 2005, 2008) ou HEK293 (100 nM ; Giebing *et al.*, 2005), transfectées par l'UT de Rat étiqueté en C_{term} par l'*enhanced green fluorescent protein* (EGFP), entraîne l'internalisation du récepteur *via* la formation de puits de clathrine et le recrutement des arrestines. De plus, Giebing *et al.* (2005) ont démontré l'existence d'un recyclage et d'un ré-adressage de l'UT à la membrane plasmique. A l'aide de 4 mutants de l'UT de Rat tronqués dans la partie C_{term}, et d'un mutant dont les 4 résidus sérine (364-367) ont été remplacés par des résidus alanine, Proulx *et al.* (2005) ont mis en évidence le rôle crucial de ce cluster de sérines dans l'internalisation de l'UT. Les récents travaux de cette équipe révèlent que des récepteurs mutés au niveau du résidu Asp⁹⁷, conservé pour les RCPG de classe A, ou au niveau de l'Arg¹⁴⁸ du motif ERY, mimant ainsi un des polymorphismes identifiés pour l'UT, sont incapables de s'internaliser et de recruter la β-arrestine (Proulx *et al.*, 2008). Toutefois, aucune étude n'a encore démontré une implication pathologique de ce polymorphisme.

2.4. Localisation de l'UT

2.4.1. Localisation périphérique

Les propriétés vasoactives de l'UII, établies dès les années 1980 chez les rongeurs (Gibson *et al.*, 1984 ; Gibson, 1987), suggéraient la présence de l'UT dans le système cardiovasculaire. Chez les hominidés, des niveaux élevés d'ARNm ont été mesurés dans le myocarde (Maguire *et al.*, 2000 ; Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes (Ames *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002) et les ventricules (Ames *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003 ; Elshourbagy *et al.*, 2002) (Tableau 7). Chez les rongeurs, l'UT est majoritairement exprimé dans le cœur (Nothacker *et al.*, 1999 ; Maguire *et al.*, 2000 ; Gartlon *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002), notamment dans le ventricule gauche chez le Rat (Gong *et al.*, 2004) et le myocarde chez la Souris (Liu *et al.*, 1999). Au niveau vasculaire, l'UT est présent dans l'aorte thoracique (Ames *et al.*, 1999 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002), les artères pulmonaires et coronaires (Maguire *et al.*, 2000), mais absent des veines caves (Ames *et al.*, 1999) ou des veines saphènes (Tableau 7) (Matsushita *et al.*, 2001). Au niveau cellulaire, l'UT est exprimé dans les cellules

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
Système Nerveux Central				
Cerveau	5		7, 9	6
<i>Amygdale</i>			9	
<i>Bulbe olfactif</i>			7, 9	
<i>Cortex</i>	13, 18		7, 9, 14	
<i>Hippocampe (glie)</i>			7, 11, 9	
<i>Hypothalamus (glie)</i>	18		7, 11, 9	
<i>Thalamus</i>			11, 9, 14	
Moelle épinière	19	6	7, 9, 14	12
Cervelet			7, 9, 14	
Tronc cérébral	18		7, 11, 9	
<i>Noyaux du pons</i>			9	
<i>Neurones cholinergiques mésopontins</i>			2	
<i>Noyau du nerf abducens</i>			9, 13, 14	
<i>Noyaux du septum latéral</i>			2, 9, 14	
<i>Noyaux interpédonculaires</i>			2, 9	
<i>Aire tegmentale latéro-dorsale</i>			2, 9	
<i>Noyau habénulaire médian</i>			2, 9	
<i>Noyau pédonculopontin du tegmentum</i>			2, 9	
Système Cardiovasculaire				
Cœur	1, 5, 12, 19	6	7, 17	6, 12
<i>Myocarde</i>	4, 13		8, 14, 20	
<i>Oreillettes</i>	1, 15, 18	6	14	
<i>Ventricules</i>	1, 4, 13, 18, 21	6	8 14	
Aorte thoracique	1, 15	6	13, 17	6
Artère pulmonaire			14	
Veine saphène	15		14	
Système Endocrinien				
Hypophyse	18		9	
Pancréas	1, 5	6		6
Surrénale	18	6	14	6
Testicule	5		7	6
Thyroïde		6		
Placenta	5, 18			
Systèmes Urogénital et Gastrointestinal				
Rein	3, 5, 13, 15, 16, 18, 19	6	7, 14	6
Vessie	12			6, 12
Prostate	5			
Œsophage		6		6
Estomac		6		6
Intestin	5, 18	6		6
Foie	5, 10, 19		7	
Autres tissus				
Thymus	5			
Rate	5		7	6
Poumon	5	6	7	6
Muscle squelettique	1, 5, 12, 13	6	14	6

endothéliales et musculaires vasculaires lisses (Ames *et al.*, 1999 ; Douglas *et al.*, 2002 ; Totsune *et al.*, 2003). En accord avec la distribution de l'UII chez l'Homme (Watson et May, 2004), l'UT est fortement exprimé dans les reins (Maguire *et al.*, 2000 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Matsushita *et al.*, 2001), plus particulièrement dans la medulla (Disa *et al.*, 2006). Toutefois, les niveaux d'expression sont faibles chez le Singe (Elshourbagy *et al.*, 2002) et la co-localisation UII/UT n'est pas retrouvée chez les rongeurs (Tableau 7) (Maguire *et al.*, 2000 ; Gartlon *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008). Les tissus endocrines constituent également des sites d'expression de l'UT, avec de fortes densités du récepteur dans l'hypophyse, le pancréas et la glande surrénale chez l'Homme (Ames *et al.*, 1999). De faibles niveaux d'ARNm sont aussi détectés dans le testicule (Gartlon *et al.*, 2001) et l'hypophyse (Jégou *et al.*, 2006) de Rat. Dans le cas du Singe et de la Souris, le pancréas et la surrénale expriment l'UT mais pas l'UII (Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008), confirmant que les expressions du récepteur et de son ligand ne sont pas forcément superposables (Tableau 7).

De nombreux autres tissus périphériques présentent des niveaux d'expression significatifs d'UT, variant selon les espèces. Il s'agit du tractus gastrointestinal (Gartlon *et al.*, 2001 ; Dubessy *et al.*, 2008), des muscles squelettiques (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Maguire *et al.*, 2000 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008), des poumons (Ames *et al.*, 1999 ; Gartlon *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008), des tissus lymphoïdes (Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008), de la vessie (Liu *et al.*, 1999) et du foie (Totsune *et al.*, 2003) (Tableau 7).

⇒ **Tableau 7 : Localisations centrale et périphérique de l'UT chez les Mammifères.** Ce tableau a été réalisé à partir de données obtenues par RT-PCR, RT-PCR quantitative, hybridation *in situ*, southern blot, northern blot, immunohistochimie ou des études de liaison par autoradiographie ou microscopie confocale. La numérotation des références est propre à ce tableau : 1, Ames *et al.*, 1999 ; 2, Clark *et al.*, 2001 ; 3, Disa *et al.*, 2006 ; 4, Douglas *et al.*, 2002 ; 5, Douglas *et al.*, 2004a ; 6, Elshourbagy *et al.*, 2002 ; 7, Gartlon *et al.*, 2001 ; 8, Gong *et al.*, 2004 ; 9, Jégou *et al.*, 2006 ; 10, Leifeld *et al.*, 2009 ; 11, Lin *et al.*, 2003b ; 12, Liu *et al.*, 1999 ; 13, Maguire *et al.*, 2000 ; 14, Maguire *et al.*, 2008 ; 15, Matsushita *et al.*, 2001 ; 16, Mori *et al.*, 2009 ; 17, Nothacker *et al.*, 1999 ; 18, Totsune *et al.*, 2001 ; 19, Totsune *et al.*, 2003 ; 20, Tzanidis *et al.*, 2003 ; 21, Zhang *et al.*, 2002.

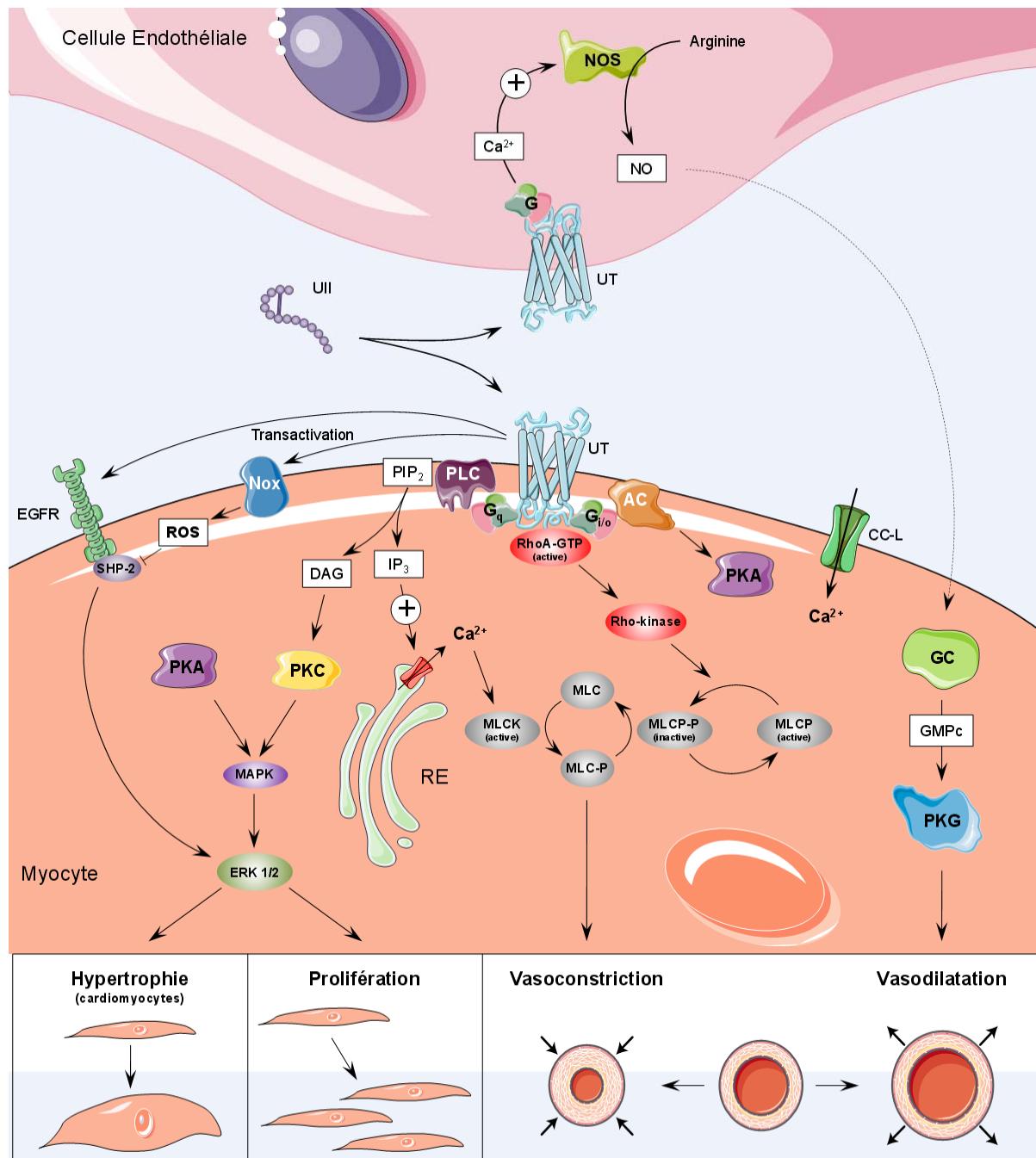


Figure 16 : Voies de transduction associées au récepteur UT impliquées dans les effets vasculaires de l'UII. AC, adénylyl cyclase ; CC-L, canal calcique de type L ; DAG, diacyglycérol ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; GC, guanylyl cyclase ; IP₃, inositol 1,4,5 triphosphate ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; MLC, *myosin light chain* ; MLCK, *myosin light chain kinase* ; MLCP, *myosin light chain phosphatase* ; NO, monoxyde d'azote ; NOS, NO synthase ; Nox, NADPH oxydase ; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5 diphosphate ; PKA, protéine kinase A ; PKC, protéine kinase C ; PKG, protéine kinase G ; PLC, phospholipase C ; RE, réticulum endoplasmique ; Rho, *ras homolog gene family* ; ROS, *reactive oxygen species* ; SHP-2, *src homology 2-containing tyrosine phosphatase*.

2.4.2. Localisation dans le SNC

Les données disponibles à ce jour indiquent que le gène de l'UT est largement exprimé dans le SNC des Mammifères (Tableau 7). Le tronc cérébral est particulièrement riche en UT chez l'Homme et le Rat mais seule la moelle épinière humaine présente des taux élevés d'ARNm (Gartlon *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003 ; Jégou *et al.*, 2006). Dans le cerveau, une forte densité d'ARNm codant le récepteur est détectée dans la région mésopontine tegmentale, notamment dans les neurones cholinergiques des aires pedonculopontine et latéro-dorsale (Clark *et al.*, 2001). Les autres régions du SNC présentent des niveaux d'expression relativement faibles avec une variabilité inter-espèces. A titre d'exemple, dans la moelle épinière de Singe (Elshoubagy *et al.*, 2002) et de Souris (Liu *et al.*, 1999 ; Elshoubagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008), l'UT est très faiblement exprimé comparativement à ce qui est observé chez l'Homme (Totsune *et al.*, 2003). L'UT est également présent dans les vaisseaux sanguins cérébraux, plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales des microvaisseaux (Spinazzi *et al.*, 2006). Enfin, Lin *et al.* (2003b) ont démontré une immunoréactivité liée à l'UT dans le tronc cérébral et l'hypothalamus localisée dans une sous-population de cellules gliales de type astrocytaire, et Castel *et al.* (2006) ont mis en évidence une expression fonctionnelle de l'UT dans le cortex de Rat.

2.5. Voies de transduction associées à l'UT

Des données obtenues à partir de cellules transfectées par l'ADNc codant l'UT, ou d'anneaux d'aortes thoraciques ont clairement démontré que la principale voie de transduction associée à l'UT correspond à l'activation d'une protéine G de type $G_{\alpha q/11}$. La liaison de l'UII à son récepteur entraîne donc le recrutement des pools calciques intracellulaires *via* la production d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) consécutive à l'activation d'une phospholipase C (PLC) (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Nothacker *et al.*, 1999 ; Saetrum Opggaard *et al.*, 2000 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Rossowski *et al.*, 2002 ; Tzanidis *et al.*, 2003 ; Castel *et al.*, 2006) (Figure 16). Plusieurs études ont également mis en évidence un couplage à la protéine $G_{\alpha i/o}$ impliqué dans la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de ERK

(*extracellular signal-regulated kinase*) (Ziltener *et al.*, 2002 ; Douglas *et al.*, 2004 ; Castel *et al.*, 2006 ; Jarry *et al.*, *in press*). L'effet vasoconstricteur de l'UII implique les canaux calciques, la PKC, des tyrosine kinases, la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, ERK, l'activation de la voie RhoA/Rho kinase et/ou la phosphorylation préalable de la *myosin light chain-2* (MLC-2) *via* l'activation d'une *MLC kinase* (Sauzeau *et al.*, 2001 ; Rossowski *et al.*, 2002 ; Russell and Molenaar, 2004 ; Tasaki *et al.*, 2004). L'effet vasodilatateur de l'UII sur les artères pulmonaires et coronaires implique quant à lui la production de NO et l'activation de la cyclooxygénase (Katano *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2004) (Figure 16). Bien avant la caractérisation de l'UT, plusieurs travaux avaient déjà établi un lien entre l'activité contractile de l'UII et d'autres voies intracellulaires comme celle de la phospholipase A₂ (Gibson, 1987 ; Gibson *et al.*, 1988 ; Itoh *et al.*, 1988). Le rôle de l'acide arachidonique fût par la suite confirmé sur un modèle de muscles lisses de Grenouille (Yano *et al.*, 1995) ainsi que dans un modèle de récepteur UT recombinant de Rat (Mori *et al.*, 1999).

Les effets mitogènes de l'UII observés sur des lignées transfectées par l'ADNc codant l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) et sur des cellules natives comme les cellules épithéliales rénales (Matsushita *et al.*, 2003) ou musculaires lisses (Tamura *et al.*, 2003), sont relayés par l'activation de ERK. La calmoduline, la PKC et la MAPK sont également impliquées dans ce processus mitogène, qui pourrait dépendre d'une protéine G_{ai/o} sensible à la toxine pertussique (Ziltener *et al.*, 2002). Enfin, dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'action mitogène de l'UII est sous-tendue par l'activation de la voie RhoA/Rho kinase (Sauzeau *et al.*, 2001).

Des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertrophie des cardiomyocytes seraient en partie relayées par l'effet de l'UII sur l'activation de la p38 MAPK et de ERK *via* un mécanisme impliquant la transactivation du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGFR) (Zou *et al.*, 2001 ; Onan *et al.*, 2004). Des travaux plus récents montrent que l'UII stimule la production de radicaux oxygénés libres par la NAD(P)H oxydase (Djordjevic *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2009), qui entraîneraient une inhibition de l'activité de la tyrosine phosphatase à

domaine SH2, facilitant ainsi la phosphorylation de l'EGFR (Chen *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009).

Au niveau central, Filipeanu *et al.* (2002) ont démontré que l'UII mobilise le calcium extracellulaire dans les neurones de moelle épinière de Souris. Dans ce cas précis, l'influx calcique est relayé par des canaux de type N dont l'ouverture est sous-tendue par l'activation d'une PKA et d'une PKC. De plus, l'UII est capable de provoquer une dépolarisation membranaire des neurones cholinergiques du tegmentum ventral qui pourrait jouer un rôle majeur dans le sommeil en régulant le phénomène de *rapid eye movement* (Clark *et al.*, 2005 ; de Lecea and Bourgin, 2008). Un effet dépolarisant de l'UII et de l'URP a également été mis en évidence dans les astrocytes corticaux de Rat (Jarry *et al.*, *in press*).

3. Activités biologiques de l'UII

3.1. Effets cardiovasculaires de l'UII

3.1.1. Effets *ex vivo* et *in vitro*

Bien avant la première purification de l'UII (Pearson *et al.*, 1980), plusieurs groupes avaient montré que des extraits d'urophyses contiennent des composés capables d'augmenter l'activité contractile de muscles lisses vasculaires de poissons (Lederis, 1969, 1970a, b ; Chan and Bern, 1976 ; Berlind, 1972). En accord avec ces expériences pilotes, il a ensuite été montré que l'application d'UII sur des anneaux d'aortes thoraciques dépourvus d'endothélium, entraîne une vasoconstriction chez le Rat (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Chatenet *et al.*, 2004), le Singe (Ames *et al.*, 1999), le Lapin (Saetrum-Opggaard *et al.*, 2000) et l'Homme (Maguire *et al.*, 2000 ; MacLean *et al.*, 2000 ; Russell *et al.*, 2001 ; Camarda *et al.*, 2002a) (Tableau 8). Des résultats similaires ont été obtenus sur ce modèle avec l'URP (Chatenet *et al.*, 2004). Toutefois, sur des vaisseaux intacts, l'UII provoque une vasodilatation, notamment sur les artères pulmonaires, mésentériques et fémorales chez le Rat (Ames *et al.*, 1999), le Chat (Behm *et al.*, 2004a) et l'Homme (MacLean *et al.*, 2000). Ces derniers effets seraient relayés par la libération de NO qui présente des propriétés myorelaxantes (Bottrill *et al.*, 2000 ; Katano *et al.*, 2000 ; Gray *et al.*, 2001 ; Abdelrahman *et*

	Homme	Singe	Rat	Souris
Système Vasculaire				
In vitro				
<i>Anneaux d'aorte</i>	Constriction ^{9, 20, 21, 23}	Constriction ⁴	Constriction ^{4, 8, 9, 10, 11, 19}	
<i>Artère fémorale</i>	Dilatation ²⁰		Dilatation ⁴	
<i>Artère pulmonaire</i>	Dilatation ²⁰		Constriction ²⁰ , Dilatation ⁴	
<i>Artère mésentérique</i>	Dilatation ²⁰		Constriction ^{6, 9} , Dilatation ^{4, 8, 13}	
<i>Artère de résistance</i>			Dilatation ⁸	
<i>Veine saphène</i>	Constriction ²¹			
<i>Veine ombilicale</i>	Constriction ^{9, 21}			
In vivo				
<i>i.v. chronique</i>	Vasoconstriction ⁷	Vasoconstriction ^{4, 31}		
<i>i.v. aiguë</i>	Vasoconstriction ²¹	Arrêt cardiaque ^{4, 31}	Dilatation ¹²	
<i>Intradermique</i>	Vasoconstriction ¹⁹			
Système Cardiaque				
In vitro				
<i>Artère coronaire</i>	Constriction ²¹		↑ Pression artérielle ¹⁷ Constriction ⁸ , Dilatation ²²	
<i>Ventricule droit</i>	↑ Contractilité ²⁶			
<i>Oreille droite</i>	↑ Contractilité ²⁴			
<i>Muscle papillaire</i>			↑ Contractilité ¹⁶	
<i>Cardiomyocytes</i>			↑ Contractilité ²⁴ , Prolifération ²⁴ , Hypertrophie ³²	
In vivo				
<i>i.v. chronique</i>			Pression artérielle (↓) ^{13, 15} , (↑) ⁶ , ↑ Résistance vasculaire ⁶	
<i>i.v. aiguë</i>			↓ Pression artérielle ^{1, 13, 15, 18} , ↑ Rythme cardiaque ^{1, 13, 15, 18} , Tachycardie ^{12, 15}	
Système Immunitaire				
In vitro				
<i>Culture PBMC</i>	Chémo-attraction ²⁵			
In vivo				
<i>i.v. chronique</i>			Extravasation ¹⁴	Extravasation ²⁸
Système Rénal				
<i>i.v. chronique</i>		Filtration glomérulaire (↓) ² , (↑) ³⁰ , Excration de Na ⁺ (↓) ² , (↑) ³⁰ , Débit urinaire (↓) ² , (↑) ²⁹ , Flux sanguin (↓) ² , (↑) ³⁰		
<i>i.v. aiguë</i>		↓ Filtration glomérulaire ^{5, 28} , ↓ Excration de Na ⁺ ^{5, 28} , ↓ Débit urinaire ^{5, 27} , ↓ Flux sanguin ⁵		
Système Endocrinien				
Perfusion pancréatique			↓ Libération d'insuline ^{26, 27}	
Cellules cortico-surrénaliennes			↓ Libération basale de corticostéron ³	

al., 2002 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Prosser *et al.*, 2006) (Tableau 8). La présence de l'UT dans les cellules musculaires vasculaires lisses (Ames *et al.*, 1999 ; Gong *et al.*, 2004 ; Maguire *et al.*, 2008) (Tableau 8) et dans les cellules endothéliales (Ames *et al.*, 1999 ; Bottrill *et al.*, 2000) suppose donc que les propriétés vasoactives de l'UII reflètent une composante directe (vasoconstrictrice) et indirecte (vasodilatatrice). Les effets de l'UII sur le réseau veineux semblent quant à eux se limiter à quelques vaisseaux comme les veines saphènes et ombilicales chez l'Homme (Maguire *et al.*, 2000) ou la veine jugulaire chez le Lapin (Camarda *et al.*, 2002a). Le fait que l'invalidation du gène codant l'UT chez la Souris entraîne la perte des activités contractiles de l'UII, confirme que les propriétés vasoactives du peptide sont bien relayées par ce récepteur (Behm *et al.*, 2003).

En marge du contrôle du tonus vasculaire, le système urotensinergique jouerait également un rôle dans la régulation de l'activité cardiaque. Perfusionnée sur des cœurs isolés de Rat, l'UII provoque une élévation de la pression coronarienne (Gray *et al.*, 2001) et exerce un effet inotrope positif chez l'Homme plus puissant que celui observé avec l'endothéline-1, la sérotonine ou la noradrénaline (Russell *et al.*, 2001). Sur des myocytes vasculaires humains (Sauzeau *et al.*, 2001) et de Lapin (Watanabe *et al.*, 2001), l'UII stimule la prolifération cellulaire. Dans le premier cas, cet effet mitogène s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette avec formation de fibres d'actine de stress (Sauzeau *et al.*, 2001).

3.1.2. Effets *in vivo*

Compte tenu du potentiel thérapeutique de ligands de l'UT dans le traitement de pathologies cardiovasculaires, la littérature scientifique dans ce domaine est particulièrement

⇒ **Tableau 8 : Effets périphériques de l'UII chez les Mammifères.** La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Abdelrahman et Pang, 2002 ; **2**, Abdel-razik *et al.*, 2008 ; **3**, Albertin *et al.*, 2006 ; **4**, Ames *et al.*, 1999 ; **5**, Balment *et al.*, 2005 ; **6**, Bennett *et al.*, 2004 ; **7**, Böhm and Pernow, 2002 ; **8**, Bottrill *et al.*, 2000 ; **9**, Camarda *et al.*, 2002a ; **10**, Camarda *et al.*, 2002b ; **11**, Chatenet *et al.*, 2004 ; **12**, Gardiner *et al.*, 2001 ; **13**, Gardiner *et al.*, 2004 ; **14**, Gendron *et al.*, 2004 ; **15**, Gibson *et al.*, 1986 ; **16**, Gong *et al.*, 2004 ; **17**, Gray *et al.*, 2001 ; **18**, Hassan *et al.*, 2003 ; **19**, Leslie *et al.*, 2000 ; **20**, MacLean *et al.*, 2000 ; **21**, Maguire *et al.*, 2000 ; **22**, Prosser *et al.*, 2006 ; **23**, Russell *et al.*, 2001 ; **24**, Sauzeau *et al.*, 2001 ; **25**, Segain *et al.*, 2007 ; **26**, Silvestre *et al.*, 2001 ; **27**, Silvestre *et al.*, 2004 ; **28**, Song *et al.*, 2006 ; **29**, Vergura *et al.*, 2004 ; **30**, Zhang *et al.*, 2003 ; **31**, Zhu *et al.*, 2004 ; **32**, Zou *et al.*, 2001. i.v., intraveineuse ; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

étoffée (Tableau 8). Les données obtenues chez l'animal ont démontré que l'injection périphérique en bolus intraveineux d'UII (Gibson *et al.*, 1986 ; Gardiner *et al.*, 2001 ; Abdelrahman and Pang, 2002) ou d'URP (Sugo *et al.*, 2003) chez des rats anesthésiés entraîne une diminution lente et prolongée de la pression artérielle. Cependant, administrée de manière chronique, l'UII provoque une augmentation de la résistance vasculaire accompagnée d'une élévation de la pression artérielle (Bennett *et al.*, 2004). Chez des macaques non vigiles, l'UII est tellement efficace qu'elle entraîne la mort de l'animal par collapsus et arrêt cardiaque. En dépit de la proximité phylogénétique, les rares données physiologiques disponibles chez l'Homme, sont très différentes. En effet, selon les études, l'injection d'UII par voie intradermique (Leslie *et al.*, 2000) ou intraveineuse (i.v.) (Bohm and Pernow, 2002) provoque une vasoconstriction locale, ou bien est sans effet (Wilkinson *et al.*, 2002) (Tableau 8).

L'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'UII induit une élévation du débit cardiaque et de la pression systémique chez le Rat (Lin *et al.*, 2003a, b) (Tableau 8) et la Truite (Le Mével *et al.*, 1996 ; Lancien *et al.*, 2004). L'application directe d'UII dans les noyaux paraventriculaire et arqué, ou dans l'aire A1, a permis de montrer que ces structures cérébrales sont en partie impliquées dans les activités centrales du système urotensinergique dans le contrôle de l'activité cardiaque (Lu *et al.*, 2002) (Tableau 8). L'ensemble de ces travaux met en évidence un rôle du système urotensinergique dans le contrôle central et périphérique du système cardiovasculaire, dépendant de l'espèce étudiée et du mode d'application de l'UII.

3.1.3. UII et maladies vasculaires

La présence d'UII circulante associée aux propriétés vasoactives de l'UII et de l'URP constituent des éléments clés en faveur d'un rôle du système urotensinergique dans les processus liés à l'hypertension artérielle. De fait, les patients atteints d'une hypertension systémique présentent des taux plasmatiques (Cheung *et al.*, 2004) et urinaires (Matsushita *et al.*, 2001) d'UII supérieurs à ceux retrouvés chez les sujets normo-tendus. Par ailleurs, une forte immunoréactivité de l'UII a été retrouvée dans les cellules endothéliales et les

macrophages au niveau des coronaires de patients atteints d'athérosclérose (Ames *et al.*, 1999 ; Maguire *et al.*, 2004). L'UII pourrait donc participer aux processus de remodelage tissulaire liés à l'athérosclérose, en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses (Sauzeau *et al.*, 2001), responsable d'une augmentation du diamètre de la paroi des vaisseaux. De plus, l'activité mitogène de l'UII est potentialisée par la forme oxydée de la *low-density lipoprotein* libérée par les cellules endothéliales (Watanabe *et al.*, 2001). Enfin, l'extravasation vasculaire engendrée par l'UII au niveau de l'aorte thoracique chez le Rat (Gendron *et al.*, 2004) pourrait concomitamment favoriser l'infiltration de cellules inflammatoires activées, elles-mêmes susceptibles d'exacerber la pathogénicité de l'athérosclérose.

3.1.4. UII et maladies du myocarde

Bien que les maladies cardiaques soient souvent intimement liées aux processus physiopathologiques vasculaires, l'UII pourrait aussi être directement impliquée dans certaines pathologies cardiaques, dont l'infarctus du myocarde. D'après une étude menée par Richards *et al.* (2002), les concentrations plasmatiques d'UII sont positivement corrélées avec la sévérité de la maladie. Très récemment, une autre équipe a montré, à l'aide d'un modèle animal d'insuffisance cardiaque congestive, que l'UII, l'URP et l'UT sont surexprimés dans le tissu cardiaque (Nakayama *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que le niveau d'expression de l'URP est dix fois supérieur à celui de l'UII, suggérant ainsi que l'URP pourrait jouer un rôle important dans cette pathologie (Nakayama *et al.*, 2008).

3.2. Effets sur le système immunitaire

Plusieurs travaux ont révélé que l'UT est exprimé à la surface de certaines cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes B (Bousette *et al.*, 2004). De plus, les zones d'infiltration des macrophages présentent une immunoréactivité spécifique pour l'UII (Maguire *et al.*, 2004) et ce peptide provoque une extravasation plasmatique chez la Souris (Vergura *et al.*, 2004) et le Rat (Gendron *et al.*, 2004), suggérant que le système

urotensinergique participerait aux processus de l'inflammation en favorisant le passage de cellules infiltrantes. Plus récemment, une étude menée par Segain *et al.* (2007) sur des monocytes humains permet de considérer l'UII comme un véritable facteur chémo-attractant. Il est à noter que l'expression du gène codant l'UT est elle-même régulée par des facteurs proinflammatoires tels que l'interleukine-1 β , le *tumor necrosis factor- α* et l'interféron- γ , mais également par d'autres stimuli comme le lipopolysaccharide *via* l'activation des voies NF- κ B et RhoA/Rho kinase (Segain *et al.*, 2007). Ces résultats indiquent que le système urotensinergique interviendrait dans la réponse immunitaire en favorisant notamment le recrutement de monocytes dans la zone inflammée.

3.3. Effets rénaux de l'UII

La présence de quantités particulièrement élevées d'UII et d'UT au niveau rénal suggérait un rôle crucial de l'UII dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral (Tableau 8). Dès 1981, Marshall et Bern ont montré, sur un modèle de vessie de Gobie, que l'UII favorise la recapture de sodium. Administrée chez le Rat de façon prolongée par voie i.c.v., l'UII augmente le taux de filtration glomérulaire (Zhang *et al.*, 2003). Cependant, des effets radicalement opposés sont observés quand le peptide est injecté en bolus (Balment *et al.*, 2005 ; Song *et al.*, 2006). Le fait que l'urantide, un antagoniste de l'UT (Patacchini *et al.*, 2003), soit capable d'entraîner une élévation de la filtration glomérulaire, de la diurèse et de la natriurèse (Song *et al.*, 2006), plaide en faveur de l'implication de ce récepteur dans les effets stimulants de l'UII.

Chez des patients atteints d'une néphropathie consécutive au *diabetes mellitus*, les quantités d'UII mesurées dans le plasma (Totsune *et al.*, 2001) et dans les urines (Langham *et al.*, 2004) sont considérablement augmentées. Particulièrement élevés chez les malades souffrant d'une néphropathie en stade final, les taux circulants d'UII sont inversement proportionnels au débit cardiaque (Mallamaci *et al.*, 2005), suggérant que l'UII jouerait, dans ce cas précis, un rôle cardioprotecteur. Cependant, dans un modèle d'ischémie rénale chez le Rat, le blocage de l'UT par le palosuran prévient la vasoconstriction rénale post-ischémique,

et réduit les lésions tubulaires et glomérulaires rénales consécutives (Clozel *et al.*, 2004). Ces deux exemples apparemment contradictoires, illustrent la complexité de l'action du système urotensinergique dans un contexte pathologique rénal.

3.4. Effets sur le système endocrine

Les premières études réalisées chez des poissons ont montré que l'UII inhibe la libération de prolactine (PRL) (Grau *et al.*, 1982 ; Rivas *et al.*, 1986) et augmente le taux plasmatique de cortisol (Arnold-Reed and Balment, 1994 ; Kelsall and Balment, 1998) (Tableau 8). A l'inverse, l'UII entraîne une hausse des quantités circulantes de *thyroid-stimulating hormone* et de PRL chez le Rat (Garthron *et al.*, 2001). Chez cette même espèce, l'application d'UII sur des cellules corticosurrénaliennes en culture diminue de façon dose-dépendante la sécrétion basale de corticostérone mais ne modifie pas la sécrétion stimulée par l'hormone corticotrope (Tableau 8) (Albertin *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'UII inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre *et al.*, 2001, 2004), inhibition levée en présence de palosuran ou d'urantide (Marco *et al.*, 2008), deux antagonistes de l'UT. L'implication potentielle du système urotensinergique dans le contrôle de la glycémie est confortée par deux études qui rapportent la présence de concentrations d'UII plasmatiques élevées chez des patients souffrant d'un diabète de type II (Totsune *et al.*, 2003 ; Suguro *et al.*, 2008). Enfin, des travaux menés chez des sujets présentant le polymorphisme Ser⁸⁹Asn du gène de l'UII (*réf SNP, ID rs228648*) montrent l'existence d'une corrélation avec les taux plasmatiques de glucose et d'insuline, indiquant une possible résistance à l'insuline (Sun *et al.*, 2002 ; Wenyi *et al.*, 2003).

3.5. Effets comportementaux

La distribution de l'UII et de l'UT dans le SNC laissait présager un rôle du système urotensinergique dans le contrôle des processus liés au comportement (Tableau 9). Même si les données disponibles à ce jour sont relativement limitées, il est acquis que l'injection d'UII par voie i.c.v. augmente l'activité motrice de façon dose-dépendante et prolongée chez le Rat

(Gartlon *et al.*, 2001), la Souris (Do Rego *et al.*, 2005) (Tableau 9) et la Truite (Lancien *et al.*, 2004). Ces résultats sont en adéquation avec la présence de l'UT dans le striatum, le noyau accumbens, le cortex cérébral ou la moelle épinière (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Couloarn *et al.*, 1998, 1999, 2001 ; Gartlon *et al.*, 2001 ; Clark *et al.*, 2001).

Plusieurs tests comme le labyrinthe en croix surélevé, la chambre à compartiments sombre/clair, la planche à trous et la suspension par la queue, ont permis de mettre en évidence des propriétés anxiogènes et dépressives de l'UII chez la Souris (Tableau 9) (Matsumoto *et al.*, 2004 ; Do Rego *et al.*, 2005), suggérant fortement que le système urotensinergique interviendrait dans l'apparition de certains troubles de l'humeur. L'expression de l'UT au niveau de l'hypothalamus (aire ventromédiane, noyaux arqué et

	Rat	Souris
Système Nerveux Central		
Micro-injection		
<i>Aire tegmentale ventrale</i>	↑ [Dopamine] _{extracellulaire} ²	
Infusion		
<i>Tranche de cortex cérébral</i>	↑ [Noradrénaline] ¹⁰ , ↑ [Dopamine] ¹⁰ , ↑ [5-Sérotonine] ¹⁰ , ↑ [Histamine] ¹⁰	
Effets comportementaux		
Micro-injection		
<i>Tegmentum</i>	↑ Sommeil paradoxal ⁵	
Injection intracérébroventriculaire	↑ Activité motrice ^{2,4}	↑ Activité motrice ^{2,3} , Anxiogène ^{3,9} , Prodépressif ^{3,9} , Orexigène ³
Système Cardiovasculaire		
Micro-injection		
<i>Noyau paraventriculaire</i>	Hypertension systémique ⁸	
<i>Noyau arqué</i>	Hypertension systémique ⁸	
<i>Aire A₁ (forte dose)</i>	↓ Débit cardiaque ⁸	
<i>Aire A₁ (faible dose)</i>	↓ Pression artérielle ⁸	
Injection intracérébroventriculaire	Dilatation ¹ , ↑ Résistance vasculaire ¹ , ↑ Pression artérielle ^{6,7} , ↑ Rythme cardiaque ¹¹ , ↑ Débit cardiaque ^{6,7}	
Système Endocrinien		
Injection intracérébroventriculaire	↑ Libération de TSH et PRL ⁴	

Tableau 9 : Effets centraux de l'UII chez les rongeurs. La numérotation des références est propre à ce tableau : **1**, Chuquet *et al.*, 2008 ; **2**, Clark *et al.*, 2005 ; **3**, Do Rego *et al.*, 2005 ; **4**, Gartlon *et al.*, 2001 ; **5**, Huitron-Resendiz *et al.*, 2005 ; **6**, Lin *et al.*, 2003a ; **7**, Lin *et al.*, 2003b ; **8**, Lu *et al.*, 2002 ; **9**, Matsumoto *et al.*, 2004 ; **10**, Ono *et al.*, 2008 ; **11**, Watson *et al.*, 2008. PRL, prolactine ; TSH, *thyroid-stimulating hormone*.

supraoptique) et du tronc cérébral (noyaux du tractus solitaire et parabrachial) suppose que l'UII pourrait participer, à l'instar de nombreux autres neuropeptides, au contrôle de la prise alimentaire (Gartlon *et al.*, 2001 ; Jégou *et al.*, 2006). De fait, l'UII présente chez la Souris des propriétés orexigènes (Tableau 9) (Do Rego *et al.*, 2005), laissant entrevoir de nouvelles applications thérapeutiques potentielles pour ce peptide dans le traitement des troubles de l'alimentation.

Le sommeil est classiquement divisé en trois phases, *i.e.* sommeils léger, profond et paradoxal. Ce dernier s'accompagne de mouvements rapides des yeux (*rapid eye movement*) contrôlés par des neurones cholinergiques localisés dans l'aire tegmentale (Monaco *et al.*, 1984 ; Webster and Jones, 1988 ; Baghdoyan *et al.*, 1989 ; Quattrochi *et al.*, 1989 ; Steriade *et al.*, 1990). Or, le tegmentum est particulièrement riche en ARNm codant l'UT (Clark *et al.*, 2001) et une microinjection d'UII dans cette zone se traduit chez le Rat par une augmentation du nombre et de la durée des phases de sommeil paradoxal (Tableau 9) (Huitron-Resendiz *et al.*, 2005).

Il convient de noter que contrairement à ce qui est communément observé pour d'autres peptides impliqués dans la régulation du sommeil tels que l'hypocrétine 1 (Xi *et al.*, 2001), les deux autres phases ne sont pas modifiées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'hypocrétine agit à la fois sur les systèmes cholinergique et glutamatergique, alors que l'UII ne mobiliserait que les neurones cholinergiques (Burlet *et al.*, 2002).

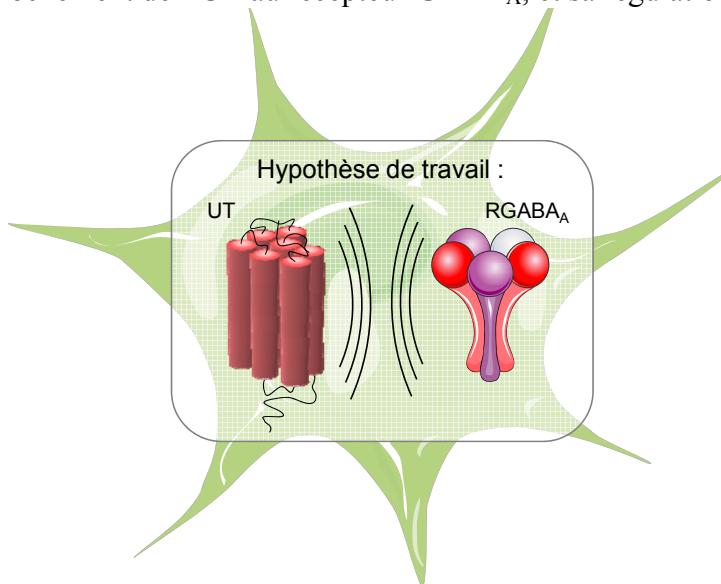
Objectifs de l'étude



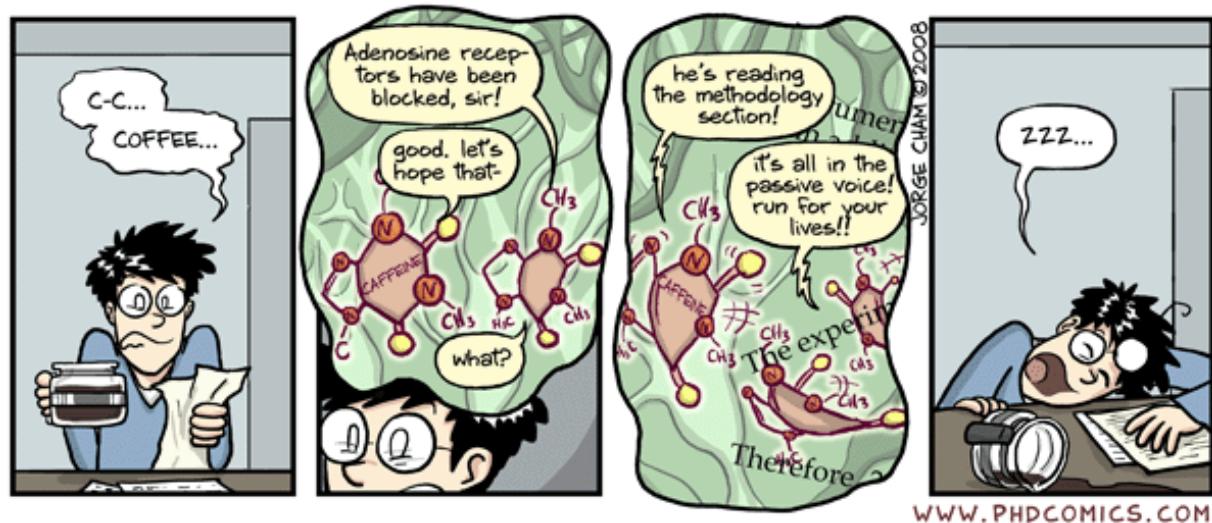
Les astrocytes constituent l'interface entre le système nerveux et le système vasculaire, et jouent un rôle clef dans la régulation métabolique, la transmission synaptique et/ou la neurogenèse et la synaptogenèse, *via* l'expression de nombreux récepteurs/canaux ioniques/transporteurs et la libération de facteurs autocrine et paracrine (Ostrow and Sachs, 2005). L'interaction entre ces deux systèmes parallèles génère des microenvironnements spécialisés nommés « niche vasculaire », dans lesquels résident des cellules endothéliales, des astrocytes et des cellules souches neurales (Barami, 2008). Dans les régions cérébrales lésées, en particulier après une ischémie cérébrale, des études récentes montrent que les vaisseaux sanguins de la niche sur-expriment des molécules vasoactives, qui pourraient contrôler la réponse astrocytaire, et la réparation tissulaire. L'UII est considéré comme le peptide vasoactif le plus puissant connu à ce jour. Bien que les gènes codant l'UII, l'URP et l'UT soient exprimés dans le SNC (de manière non ubiquiste), le rôle cellulaire et moléculaire du système urotensinergique dans le cerveau n'est pas connu. Les activités néoangiogènes de l'UII, les niveaux élevés d'ARNm codant l'UT dans des extraits de cerveaux chez l'Homme, et la présence de sites spécifiques de l'UII dans le cerveau de Rat, nous ont incités à étudier le rôle du système urotensinergique dans la régulation de la fonction astrocytaire au sein des niches vasculaires. Les travaux réalisés dans notre équipe ont *i)* mis en évidence la présence des ARNm codant l'UT et la protéine dans les astrocytes corticaux de Rat en culture (Castel *et al.*, 2006) et *ii)* montré que l'UII interagit avec des sites de très haute et haute affinité, couplés à la voie G_q-PLC-IP₃-Ca²⁺, G_{i/o}-PIPs sensible à la PTX, et aux canaux calciques de type T (Castel *et al.*, 2006 ; Diallo *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, *in press*). De plus, nous avons démontré que l'activation du site de très haute affinité pour l'UII, qui ne reconnaît pas l'URP, relaye la prolifération des astrocytes corticaux de Rat en culture (Jarry *et al.*, *in press*). Les différences d'affinité de l'UT pour l'UII et l'URP, et ses différents couplages pourraient s'expliquer par des phénomènes de plasticité dépendants de l'état de prolifération

astrocytaire, eux-mêmes sous-tendus par des interactions physiques et/ou fonctionnelles avec d'autres récepteurs. Un exemple de plasticité « récepteur » a été suggéré pour le récepteur GABA_A, dont l'expression fonctionnelle à la membrane plasmique est inversement proportionnelle à la capacité de prolifération des astrocytes, après un accident vasculaire cérébral (Tateishi *et al.*, 2006) ou dans des tumeurs astrocytaires malignes (Labrakakis *et al.*, 1998). Ces données suggèrent donc que le récepteur GABA_A est récepteur « répresseur » de prolifération cellulaire. Une étude montrant que l'UII régule la fonction GABAergique dans les neurones d'Aplysie (Sawada et Ichinose, 1999), permettait d'envisager **l'existence d'une interaction entre les effets mitogènes de l'UII et répresseur du GABA sur la prolifération astrocytaire en conditions physiopathologiques.**

L'objectif de mon travail de thèse visait donc à caractériser les mécanismes de modulation de l'activité GABAergique par l'UII, et à rechercher si cette modification fonctionnelle pouvait résulter d'une interaction physique entre le récepteur GABA_A et l'UT. Pour atteindre cet objectif, mon travail de thèse a consisté *i)* à montrer que l'UT et le récepteur GABA_A sont co-exprimés dans les astrocytes et à rechercher l'existence d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre les deux récepteurs dans ce modèle cellulaire, *ii)* à caractériser le mécanisme d'action de l'UII sur l'activité GABAergique dans les astrocytes de cervelet en co-culture avec des neurones, et dans une lignée co-exprimant l'UT et les sous-unités du récepteur GABA_A humain, et *iii)* à identifier les séquences d'interaction permettant le rapprochement de l'UT au récepteur GABA_A, et sa régulation fonctionnelle.



Matériels et Méthodes



Matériels et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Cultures d'astrocytes de Rat

La culture d'astrocytes purifiés permet la sélection d'une population homogène de cellules natives dont le transcriptome serait proche de celui des astrocytes *in vivo* (Nakagawa *et al.*, 2005). Les cultures primaires de cellules gliales sont réalisées selon un protocole inspiré de la méthode décrite par Booher et Sensenbrenner (1972). Après décapitation des rats Wistar (Depré, Saint-Doulchard, France), le cortex de rats âgés de 24-48 heures ou le cervelet de rats âgés de 8 jours est prélevé puis placé dans un milieu de culture composé d'un mélange DMEM/Ham's F12 (2/1, v/v; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) complété d'une solution d'antibiotiques-antifongique (1%, Sigma-Aldrich), de L-glutamine (2 mM, Sigma-Aldrich), d'insuline (0,001%, Sigma-Aldrich), de D(+)-glucose (0,4%, Sigma-Aldrich) et d'HEPES (5 mM, Sigma-Aldrich). Après élimination des méninges, les cellules sont dissociées de façon mécanique par passages lents et successifs au travers d'une aiguille creuse (10 cm x 1,2 mm de diamètre). La suspension cellulaire est centrifugée (5 min, 100 g), puis le culot est resuspendu et filtré sur un tamis de nylon (maillage de 100 µm) afin d'éliminer les fragments non dissociés. La densité cellulaire de la suspension est déterminée à l'aide d'un hématomètre (cellule de Neubauer) et les cellules sont ensemencées dans des flasques de 150 cm² (Dutscher, Brumath, France) à raison de 20.10⁶ cellules/flasque dans un milieu supplémenté en sérum bovin fœtal (SBF ; 10%, Eurobio, Les Ullis, France). Les cellules sont placées dans un incubateur en atmosphère humide et maintenu à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours.

Ces cultures primaires sont composées d'une majorité d'astrocytes mais présentent une proportion non négligeable d'oligodendrocytes et de cellules microgliales (Figure 18 ; Diallo and Gandolfo, communication personnelle). Après 6 à 8 jours de culture (90% de confluence),

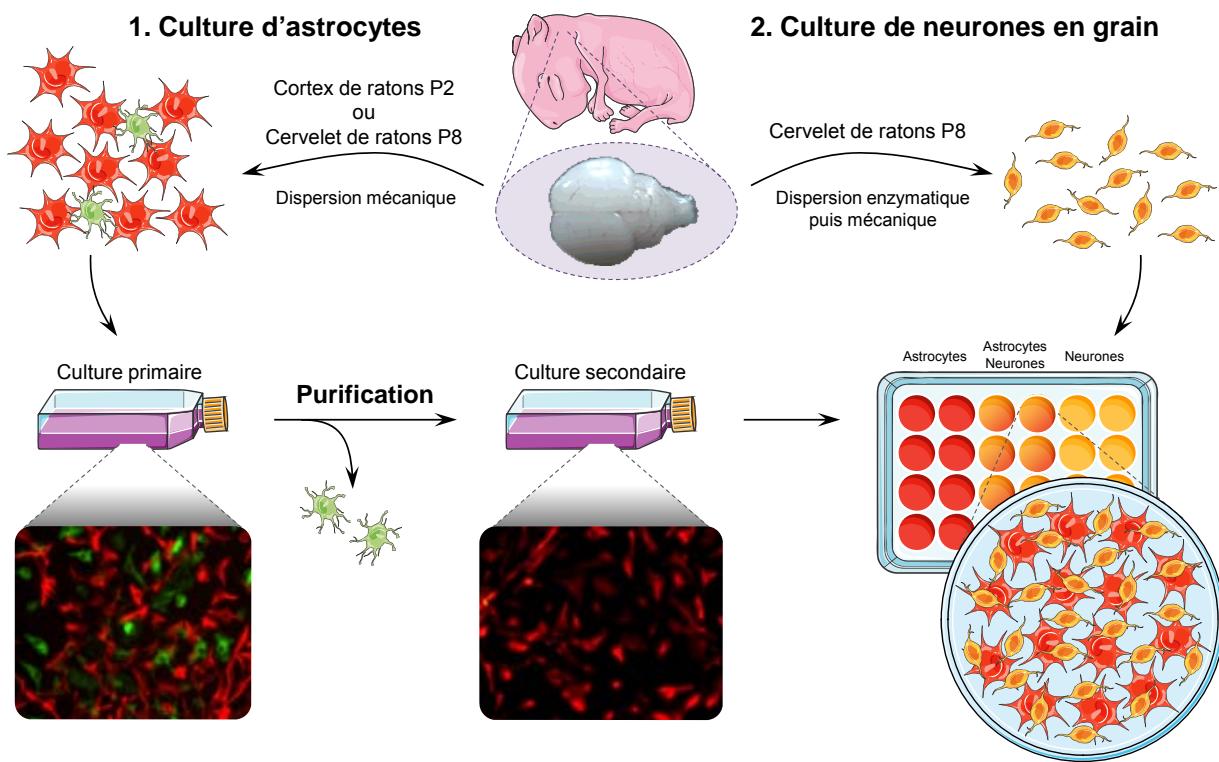


Figure 18 : Protocoles de culture d'astrocytes et de neurones en grain du cervelet. Les cultures d'astrocytes sont réalisées par dispersion mécanique à partir de cortex de rats âgés de 48h (P2) ou de cervelet de rats âgés de 8 jours (P8). Les cultures primaires, majoritairement composées d'astrocytes (marqués en rouge sur les microphotographies à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFAP), d'oligodendrocytes, et de cellules microgliales (marquées en vert à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'isolectine B4), sont purifiées par agitation orbitale. Les astrocytes issus de ces cultures secondaires, pures à plus de 99%, sont ensuite ensemencés sur un support et à une densité adaptée au type d'expérience. Les cultures de neurones en grain sont réalisées à partir de cervelet de rats âgés de 8 jours par dispersion enzymatique, à l'aide de trypsine, puis par dispersion mécanique. Les neurones ainsi obtenus sont ensemencés seuls (monocultures) ou sur un tapis d'astrocytes (cocultures), sur un support et à une densité adaptée au type d'expérience.

les cultures primaires sont purifiées en utilisant les capacités d'adhésion de chacun des types cellulaires présents dans les cultures (Brown and Mohn, 1999). Les flasques sont ainsi soumises à deux cycles successifs d'agitation orbitale (2 h puis 18 h) et les cellules encore adhérentes (astrocytes et microglie) sont détachées par une solution de trypsine-EDTA (0,05%, Sigma-Aldrich), puis centrifugées (8 min, 100 g). La suspension cellulaire est déposée 2 min dans une flasque de 150 cm² afin d'éliminer la microglie résiduelle qui adhère rapidement au support. Les astrocytes non-adhérents sont resuspendus dans du milieu de culture supplémenté par 10% de SBF puis ensemencés sur un support (préalablement traité avec une solution contenant 5 µg/mL de poly-L-lysine et 1% d'antibiotiques-antifongique) et à une densité variables selon le type d'expérimentation (Tableau 10). Les cellules sont

maintenues en culture dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO₂. Après 2 jours de culture, les cellules présentent les caractéristiques morphologiques des astrocytes de type I et plus de 99% d'entre elles expriment un marqueur astrocytaire, la *glial fibrillary acidic protein* ou GFAP (Figure 18) (Castel *et al.*, 2006).

1.2. Cultures de neurones en grain du cervelet

Les cultures primaires de neuroblastes cérébelleux sont réalisées à partir d'animaux âgés de 8 jours selon la technique développée au laboratoire par le Dr Bruno Gonzalez (Figure 18). Après décapitation, le cervelet de rats Wistar (Depré, Saint-Doulchard, France) âgés de 8 jours est prélevé puis placé dans un milieu de culture composé d'un mélange DMEM/Ham's F12 (3/1, v/v; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) complété d'une solution d'antibiotiques-antifongique (1%, Sigma-Aldrich) et de chlorure de potassium (25 mM, Sigma-Aldrich). Après élimination des méninges, les cervelets sont hachés et les morceaux transférés dans 10 mL de tampon Krebs-Ringer contenant 300 µg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA) et 0,03% de MgSO₄. Après centrifugation (100 g, 15 s) et élimination du surnageant, le culot est soumis à une digestion enzymatique en ajoutant 10 mL de tampon Krebs-Ringer contenant 300 µg/mL de BSA, 0,03% de MgSO₄ et 250 µg/mL de trypsine

Expériences	Supports	Densités cellulaires (cellules/puits)		
		Astrocytes	Cellules en Grain	Lignée CHO
Mesure du métabolisme des PIPs	Boîte de Pétri Falcon 35 mm	400 000	–	–
Mesure de la production d'AMPc	Boîte de Pétri Falcon 35 mm	400 000	–	–
Mesure de la [Ca ²⁺] _c (Flexstation)	Plaque 96 puits Falcon (bord noir/fond blanc)	–	–	50 000
Immunohistochimie (mono- et co-cultures)	Plaque 24 puits Costar + lamelles de verre	20 000	750 000	200 000
Patch-clamp (mono- et co-cultures)	Plaque 24 puits Costar + lamelles de verre	20 000	750 000	200 000

Tableau 10 : Ensemencement des cellules et choix des supports selon le type d'expérience. AMPc, 3',5'-adénosine monophosphate cyclique ; [Ca²⁺]_c, concentration cytosolique de calcium ; PIPs, polyphosphoinositides.

(5 min ; RT). L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 10 mL de tampon Krebs-Ringer contenant 300 µg/mL de BSA, 0,076% de MgSO₄, 100 µg/mL d'inhibiteur de trypsine et 15 µg/mL de désoxyribonucléase I (Sigma-Aldrich). Après centrifugation (100 g, 15 s), une dissociation mécanique est réalisée dans le même tampon Krebs-Ringer. La suspension est ensuite ajoutée à 5 mL de tampon Krebs-Ringer contenant 300 µg/mL de BSA, 0,03% de MgSO₄ et 0,0014% de CaCl₂, puis centrifugée (100 g, 5 min). Le culot cellulaire est resuspendu dans 5 mL de milieu de culture, et la densité cellulaire est déterminée à l'aide d'une chambre de numération de type Neubauer. Les neuroblastes sont ensuite distribués dans des plaques 24 puits, contenant des lamelles de verres préalablement coatées avec une solution de poly-L-lysine (5 µg/mL, 1% d'antibiotiques-antifongique), dans du milieu de culture supplémenté par 10% de SBF. Afin de préserver la pureté des cultures primaires de neuroblastes, de la cytosine arabinofuranoside (3 µM, Sigma-Aldrich) est ajoutée 24 h après l'ensemencement pour limiter la prolifération des cellules gliales. Les cultures sont maintenues dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO₂.

1.3. Cocultures astrocytes/neurones en grain

Les cocultures astrocytes/neurones en grain sont obtenues en déposant directement les cellules en grain (750 000 cellules/puits) sur les cultures secondaires d'astrocytes cérébelleux âgées de 24 h ensemencées dans des plaques 24 puits au fond desquelles ont été déposées des lamelles de verre coatées avec une solution de poly-L-lysine (Figure 18). Les cocultures sont maintenues dans un milieu de type neuronal et placées dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO₂.

1.4. Lignées cellulaires

Les cellules CHO (ECACC, Salisbury, Royaume-Uni) et CHO exprimant stablement l'UT humain (CHO-UT) sont maintenues dans un milieu de culture Ham's F12 contenant 10% de SBF, de la glutamine (2 mM, Invitrogen) et 1% d'antibiotiques/antifongique (Sigma-Aldrich), et incubées en atmosphère humide à 37°C et à 5% CO₂. Les cellules sont repiquées

lorsqu'elles arrivent à 85-95% de confluence. Brièvement, après rinçage au PBS, les cellules sont incubées dans une solution de trypsine-EDTA (1 mM, 2 mL) pendant 2 min à 37°C. La réaction est inhibée par ajout de milieu de culture et la suspension cellulaire est centrifugée (100 g, 5 min). Les cellules sont resuspendues et ensemencées à une dilution de 1/10^{ème} dans une flasque de 75 cm² (Dutscher).

Les cellules CHO-UT exprimant de manière stable l'UT humain (cloné dans le vecteur pIRES-neo2) ont été produites dans notre Unité par les Drs C. Dubessy et I. Lirhmann. Les cellules CHO-UT sont sélectionnées à l'aide de la généticine (G418, 400 µg/mL, Sigma-Aldrich) ajoutée systématiquement dans le milieu de culture.

2. Biologie moléculaire

2.1. Plasmides recombinants

Les ADNc codant les sous-unités α_2 , β_1 , β_3 , γ_1 et γ_2 humaines du récepteur GABA_A, clonées dans les vecteurs d'expression pCDM8 (α_2 , β_1 et γ_2) et pcDNA1/Amp (β_3 et γ_1), ont été généreusement donnés par le Dr. Wingrove (*Material Transfert Agreement*, MTA ; Merck Sharp and Dohme, Harlow, Royaume-Uni). L'ADNc codant le récepteur UT humain (pcDNA3.1) a été obtenu auprès du *cDNA Resource Center* (MTA, Missouri University of Science and Technology, Etats-Unis). Le plasmide recombinant GFP (pmaxGFP) provient du kit de transfection Amaxa (Lonza, Cologne, Allemagne). Les vecteurs pCMV-HA et pCMV-c-myc ont été acheté chez Clontech (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France). Le Tableau 11 résume les plasmides utilisés pour chaque expérience.

Pour certaines expériences, les sous-unités β_3 et γ_2 du récepteur GABA_A et l'UT ont été sous-clonées dans les vecteurs pCMV-c-myc et/ou pCMV-HA. De même, la stratégie mise en œuvre pour identifier les régions de l'UT et du récepteur GABA_A impliquées dans le couplage fonctionnel de ces deux récepteurs a consisté *i)* à tronquer l'UT dans sa partie C_{term} pour générer les mutants UT₃₇₀, UT₃₅₁, UT₃₃₂ et UT₃₁₉, dont les ADNc sont sous-clonés dans les vecteurs pCMV-HA et pCMV-c-myc, et *ii)* à produire des peptidomimétiques correspondant aux boucles i₂ des sous-unités α_2 , β_3 et γ_2 , ou à l'extrémité C_{term} de l'UT, leurs ADNc étant

Expériences/ Protocole	Lignées Cellulaires	ADNc
Patch-clamp	CHO-UT	$\alpha_2, \beta_1, \gamma_2, \beta_3, \gamma_1$
Patch-clamp (Mutants tronqués de l'UT)	CHO	$\alpha_2, \beta_3, \gamma_2 +$ $UT^{HA} / UT_{370}^{HA} / UT_{351}^{HA}$ $/ UT_{332}^{HA} / UT_{319}^{HA}$
Patch-clamp (UT fragment C _{term})	CHO-UT	$\alpha_2, \beta_3, \gamma_2 + UT_{319-389}^{c-myc}$
Patch-clamp (Boucles i ₂ des sous-unités du récepteur GABA _A)	CHO-UT	$\alpha_2 (335-419)^{HA} / \beta_3 (328-450)^{c-myc} / \gamma_2 (357-443)^{c-myc}$
Immunocytochimie (Colocalisation)	CHO	$\alpha_2, \beta_3^{c-myc}, \gamma_2 + UT^{HA}$
Immunocytochimie (Internalisation)	CHO	$\alpha_2, \beta_3, \gamma_2^{c-myc} + UT$
Mesure de la [Ca ²⁺] _c (Flexstation – Mutants de l'UT)	CHO	$UT^{c-myc} / UT_{370}^{c-myc} / UT_{351}^{c-myc} /$ $UT_{332}^{c-myc} \text{ ou } UT_{319}^{c-myc}$

Tableau 11 : Lignées cellulaires et ADNc utilisés selon le type d’expérience. [Ca²⁺]_c, concentration cytosolique de calcium ; CHO, lignée de cellules ovaries de Hamster chinois ; CHO-UT, lignée CHO exprimant stablement l’UT humain.

également sous-clonés dans les vecteurs pCMV-HA et pCMV-c-myc. Des études de microfluorimétrie et d’électrophysiologie ont permis de confirmer la fonctionnalité des construits UT et α_2, β_3 et γ_2 , respectivement.

2.2. Sous-clonage des ADNc, transformation et amplification

Après une première étape de *polymerase chain reaction* (PCR) à l’aide d’amorces spécifiques et d’une Taq polymérase haute fidélité (Invitrogen) (Tableau 12), la taille des produits de PCR est vérifiée par migration sur gel d’agarose. Les fragments d’ADNc sont ensuite purifiés en utilisant la technique d’extraction sur gel (*Gel extraction kit*, Qiagen, Courtaboeuf, France) et insérés dans le vecteur souhaité par digestion, à l’aide d’enzymes de restriction spécifiques de chaque construction (Tableau 12), puis ligation dans les vecteurs d’expression. Des bactéries compétences de type TOP10 (vecteurs pcDNA1/Amp et pCMV) ou TOP10 P3 (vecteur pCDM8) sont transformées avec ces plasmides par choc thermique puis amplifiées dans du milieu Luria Broth (Invitrogen) contenant un antibiotique de sélection

ADNc	Vecteurs d'origine	Provenance	Bactéries
α_2	pCDM8	Donation du Dr. B Wingrove (<i>Merck Sharp and Dohme</i>)	TOP10 P3
β_3	pcDNA1/Amp	Donation du Dr. B Wingrove (<i>Merck Sharp and Dohme</i>)	TOP10
γ_2	pCDM8	Donation du Dr. B Wingrove (<i>Merck Sharp and Dohme</i>)	TOP10 P3
UT	pcDNA3.1	<i>cDNA Resource Center (Missouri University)</i>	TOP10
ADNc	Vecteurs de sous-clonage	Primers	Enzymes
α_2 (335-419) ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATCGGAATTCTTATGAATTACTTCACCAAAAGAGGGATGG Anti-sens : ATCGCTCGAGTTCATCTGTCAATTGCTAACACTGTTGAA	EcoRI/XhoI
β_3 ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Sens : ATGCGTCGACCATGTGGGGCCTGCGGGAGGA Anti-sens : AAAGCGGCCGCTCAGTTAACATAGTACAGCCAGT	SalI/NotI
β_3 (328-450) ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Sens : ATCGGTCGACTATGAACATACATTTCTTGAAAGAGGC Anti-sens : ATCGGCGGCCGCTTCATCTGTCTATGGCATTACATCGGT	SalI/NotI
γ_2 ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Sens : AAAGTCGACGATGAGTTGCCAAATATATGGAG Anti-sens : AAACTCGAGTCACAGGTAGAGGTAGGAGAC	SalI/NotI
γ_2 (357-443) ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Sens : ATCGGAATTCTTATGCATTATTTGTCAAGCAACCGGAAA Anti-sens : ATCGCTCGAGTTCAGGAGTCCATTGGCAATGCGGAT	EcoRI/XhoI
UT ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATGCGAATTGGATGGCGCTGACCCCCGAGT	EcoRI/XhoI
UT ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Anti-sens : AAACTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	
UT ₃₇₀ ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATGCGAATTGGATGGCGCTGACCCCCGAGT	EcoRI/XhoI
UT ₃₇₀ ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Anti-sens : GATCCTCGAGTCAGAGGCTGTCACTGGCTGTGG	
UT ₃₅₁ ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATGCGAATTGGATGGCGCTGACCCCCGAGT	EcoRI/XhoI
UT ₃₅₁ ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Anti-sens : GATCCTCGAGTCAGAGGCTGTCACTGGCTGTGG	
UT ₃₃₂ ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATGCGAATTGGATGGCGCTGACCCCCGAGT	EcoRI/XhoI
UT ₃₃₂ ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Anti-sens : GATCCTCGAGTCAGAGGCTGTCACTGGCTGTGG	
UT ₃₁₉ ^{HA}	pCMV-HA	Sens : ATGCGAATTGGATGGCGCTGACCCCCGAGT	EcoRI/XhoI
UT ₃₁₉ ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Anti-sens : GATCCTCGAGTTCAAGGTGAGCAGCGTAGAGGAAGGGGTTGGCGCA	
UT ₃₁₉₋₃₈₉ ^{cmyc}	pCMV-c-myc	Sens : GATCGAATTCTTATGACCAGGAACCTACCGCGACCACTG Anti-sens : GATCCTCGAGTTCAAGGTGAGCAGCGTAGAGGAAGGGGTTGGCGCA	EcoRI/XhoI

Tableau 12 : Amorces, enzymes de restriction et vecteurs utilisés pour les différentes constructions de récepteurs. Amorces et enzymes de restriction utilisées pour le sous-clonage des ADNc codant les sous-unités humaines α_2 (pCDM8), β_3 (pcDNA1/Amp) et γ_2 (pCDM8) du récepteur GABA_A et l'UT humain dans les vecteurs pCMV-HA et pCMV-c-myc. Les ADNc codant les boucles i₂ des sous-unités α_2 , β_3 et γ_2 du récepteur GABA_A, les variants de l'UT tronqués dans leur partie C_{term}, ainsi que le fragment C_{term} (319-389) de l'UT ont également été sous-clonés dans les vecteurs pCMV-HA et pCMV-c-myc.

compatible avec le vecteur (ampicilline ou kanamycine). Après amplification, l'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide du kit Qiagen Mini- ou Maxiprep (Courtabœuf,

France) puis précipité à l’isopropanol et culotté par centrifugation (14 000 g, 10 min, 4°C). Les culots sont lavés à l’éthanol 70%, puis séchés à l’air libre avant d’être solubilisés dans un tampon tris-EDTA. La validité des constructions est ensuite contrôlée par digestions enzymatiques à l’aide d’enzymes de restriction spécifiques, ainsi que par séquençage (Séquence CEQ 8000, Beckman Coulter, Service commun de l’IFRMP23). La concentration et la qualité des ADN sont estimées par lecture de la densité optique à 260 et 280 nm à l’aide d’un spectrophotomètre.

3. Transfection des lignées cellulaires par nucléofection

Les lignées CHO, dont la confluence atteint 85 à 95%, sont décollées (protocole § 1.4.) et comptées. Chaque transfection nécessite 2 millions de cellules. Après centrifugation (100 g, 5 min), le milieu est soigneusement éliminé et les cellules sont resuspendues dans 100 µL de tampon de transfection fournie dans le kit commercial (Nucleofector Kit T, Lonza, Cologne, Allemagne). La solution cellulaire est ensuite rapidement mélangée aux ADNc préalablement préparés (α , β , γ , GFP et/ou UT ; ratio, 1:1:2:0,25 et/ou 1) puis l’ensemble est déposé dans une cuve de transfection fournie dans le kit. Parmi les deux programmes jusqu’alors disponibles (U-023, *high efficiency* ; H-014, *high viability*) nous utilisons le programme U-023. Après transfection, les cellules sont délicatement reprises avec 1 mL de milieu de culture puis ensemencées dans des plaques 24 puits contenant des lamelles de verre à la densité de 2.10^5 cellules/puits. Le milieu de culture des cellules est changé au bout de 12 heures afin de retirer les débris cellulaires générés lors de la transfection. Les enregistrements électrophysiologiques et les immunomarquages sont réalisés de 18 à 48 h et à 24 h post-transfection, respectivement.

4. Enregistrements électrophysiologiques

4.1. Technique de patch-clamp

Le passage d’ions à travers les membranes biologiques s’effectue au travers de canaux ioniques transmembranaires. Bien que plusieurs états conformationnels soient possibles pour

un même canal, on considère en général schématiquement uniquement les états « ouvert » et « fermé ». Ces changements conformationnels se traduisent par l'ouverture ou la fermeture des voies de passage des ions. Le sens et l'intensité de ces mouvements ioniques dépendent des forces de perméation, liées à la force de diffusion (qui tend vers l'équilibre des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane) et à la force électromotrice dépendant de la valeur du potentiel de membrane. Ces flux d'ions à travers un canal entraînent l'apparition de courants mesurables expérimentalement.

La technique de patch-clamp permet la mesure et l'étude de ces variations de courant induites par les mouvements ioniques, ainsi que l'étude du mode de régulation des canaux. Mise au point en 1976 par Neher et Sakmann (Neher et Sakmann, 1976 ; prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1992) puis perfectionnée (Hamill *et al.*, 1981), cette technique permet d'enregistrer l'activité de canaux unitaires ou de l'ensemble des canaux d'une cellule selon la configuration utilisée. Les courants mesurés sont de très faibles amplitudes, allant de quelques picoampères (pA) pour des courants unitaires à quelques nano-ampères (nA) pour les enregistrements sur cellule entière. Ainsi, cette technique rend possible l'étude en temps réel de l'activité des canaux ioniques, et en particulier l'étude des variations de cette activité induites par l'application de substances régulatrices.

4.2. Instrumentation

Le poste de patch-clamp utilisé au cours des expérimentations présentées dans ce mémoire se compose des éléments suivants (Figure 19) : **1**, Cage de Faraday assurant la protection de l'espace de manipulation vis-à-vis des perturbations électromagnétiques ; **2**, Table anti-vibratoire permettant d'amortir les vibrations mécaniques ; **3**, Microscope Leica DMLFSA (Leica, Heidelberg, Allemagne) ; **4**, Caméra *Cool Digital* (Prinston Instrument, Roper Scientific) afin de suivre l'évolution de la $[Ca^{2+}]_c$ parallèlement aux enregistrements électrophysiologiques ; **5** et **6**, Micromanipulateurs électriques 3 axes (Sutter Instrument, Novato, CA, Etats-Unis) permettant des déplacements fins, dans les trois dimensions, de la micropipette de patch et de la pipette d'éjection ; **7**, Système de perfusion par gravité pour

appliquer les solutions à tester au voisinage de la cellule (débit, 2 mL/min) ; **8**, Système d'aspiration du milieu extracellulaire ; **9**, Traceur papier (RS-3200, Gould) permettant de visualiser les courants en temps réel et de les conserver sur papier ; **10**, Convertisseur signal analogique/numérique (Digidata 1200, Axon Instruments) pour le transfert bidirectionnel de signaux entre le poste d'électrophysiologie et l'ordinateur ; **11**, Amplificateur opérationnel de type Axopatch 200A de chez Axon Instruments (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Etats-Unis) adapté à la mesure de courants de l'ordre du pA et permettant la conversion courant-tension et l'imposition d'un potentiel à la cellule par l'intermédiaire de la micropipette de patch ; **12**, Pipette d'éjection connectée à un système de pression pneumatique qui permet d'appliquer les agonistes du récepteur GABA_A à quelques micromètres de la cellule ; **13**, Micropipette de mesure en verre remplie d'une solution électrolytique dans laquelle plonge une électrode d'argent, à l'aide de laquelle est réalisé le "patch".

L'ensemble du dispositif de stimulation/détection/amplification est sous le contrôle de l'unité centrale (ordinateur) gérée par l'expérimentateur. La mesure et l'enregistrement des données expérimentales s'effectuent à l'aide du logiciel pClamp 8 (Axon Instruments).

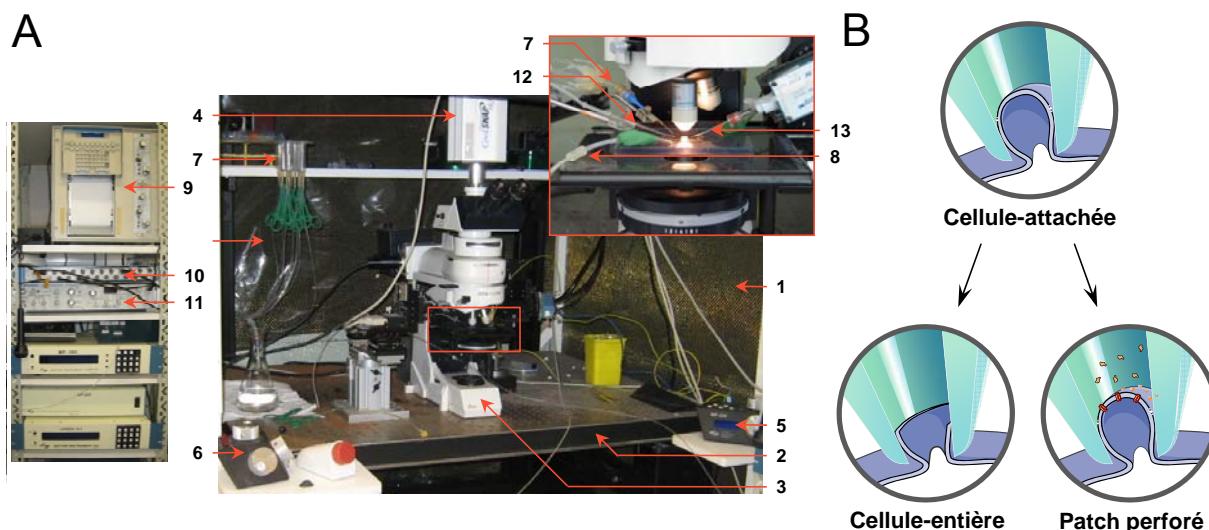


Figure 19 : Description du poste d'électrophysiologie et des configurations utilisées au cours des expériences de patch-clamp. **A.** Vue d'ensemble des équipements d'électrophysiologie et d'imagerie dynamique calcique. La numérotation se réfère à la liste des équipements mentionnés dans le paragraphe 4.2. **B.** Illustration de la configuration cellule-attachée (*haut*) à partir de laquelle il est possible d'obtenir la configuration cellule-entière (*gauche*) ou patch-perforé (*droite*).

4.3. Configurations d'enregistrement

Bien que la technique de patch-clamp ait été développée pour visualiser les courants unitaires, son champ d'application s'est rapidement étendu à l'enregistrement de courants macroscopiques correspondant à l'ouverture de l'ensemble des canaux de la cellule.

La configuration cellule-entière est obtenue à partir de la configuration cellule attachée, dans laquelle l'électrode d'enregistrement est en étroit contact avec la membrane cellulaire (résistance de l'ordre de 10 à 100 giga-Ohm ; *giga-seal*) (Figure 19B). Une faible succion, ou une impulsion électrique de quelques centaines de mV, provoque la rupture de la membrane isolée sous la pipette, tout en conservant la qualité du scellement. Ainsi, une continuité électrique s'établit entre la solution intrapiquette et la cellule, permettant l'enregistrement d'un courant global. Dans cette configuration, il est possible d'administrer, à l'intérieur de la cellule, des substances qui agissent spécifiquement sur des voies de transduction du signal couplées aux canaux ioniques. Cependant, la rupture de la membrane plasmique engendre un phénomène de diffusion entre le cytoplasme et la solution contenue dans la pipette, entraînant à terme une disparition de certaines fonctions cellulaires.

La configuration patch-perforé nécessite l'utilisation dans la solution intrapiquette d'antibiotiques tels que la nystatine, l'amphotéricine B ou la gramicidine D qui forment des pores sélectivement perméables à des petits ions (Figure 19B). Dans notre étude, nous avons utilisé la gramicidine D (Sigma-Aldrich), à la concentration finale de 100 µg/mL, qui forme des pores perméables aux ions monovalents mis à part le chlore. Ainsi, cette approche mime les conditions d'enregistrements de la configuration cellule-entière tout en conservant à la fois l'intégrité cellulaire et les concentrations intracellulaires physiologiques de chlore dans nos conditions expérimentales.

L'enregistrement de l'activité des astrocytes et des cellules en grain est réalisé en configuration patch-perforé, tandis que toutes les mesures réalisées sur les lignées CHO sont effectuées en configuration « cellule-entière ».

4.4. Microélectrodes de mesure et solutions

Les micropipettes utilisées pour le patch-clamp sont usinées à partir de capillaires de borosilicate (Brand GMBH, Wertheim, Allemagne). Ceux-ci sont portés à haute température puis étirés sous l'effet d'un poids à l'aide d'une étireuse verticale (List Medical Electronic, Darmstadt, Allemagne) afin de produire des pipettes dont l'extrémité atteint un diamètre de l'ordre du micromètre. Les micropipettes ainsi obtenues sont remplies d'une solution intracellulaire et fixées sur l'électrode d'argent chloruré permettant les mesures. L'électrode d'argent chlorurée permet la conversion des courants d'ions en solution en courant d'électrons suivant la réaction réversible suivante : $\text{Ag} + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$. De cette manière, les courants ioniques convertis en courants électroniques peuvent être enregistrés directement sur ordinateur. La pipette d'éjection, étirée à partir de capillaires de borosilicate (Harvard apparatus, Edenbridge, Royaume-Uni), est remplie d'un agoniste du récepteur GABA_A, l'isoguvacine (10^{-4} M, Sigma-Aldrich), dilué dans la solution extracellulaire, et son extrémité est cassée sous le microscope à l'aide de pinces fines afin d'obtenir un diamètre de l'ordre du micromètre. La pipette d'éjection est connectée à un « système d'éjection » par pression pneumatique, et placée à quelques dizaines de µm de la cellule (Figure 19).

Solution intracellulaire	Solutions extracellulaires	
	Astrocytes/Lignée CHO	Cellules en grain
NaCl	–	145 mM
KCl	130 mM	5,4 mM
CaCl₂	0,5 mM	2 mM
MgCl₂	2 mM	1 mM
HEPES	10 mM	10 mM
D-glucose	–	10 mM
EGTA	5 mM	–
ATP	1 mM	–
GTP	0,1 mM	–

Tableau 13 : Composition des solutions intracellulaire et extracellulaires utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques. L'ATP et le GTP sont préparés sous forme de solutions stock à 10^{-1} M et 10^{-2} M, respectivement, ajoutées extemporanément à la solution intracellulaire. EGTA, acide tétraacétique d'éthylène-glycol; HEPES, Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.

Le DMCM (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), le SR-95531 (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), le pentobarbital (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), la picrotoxine (10^{-4} M, Sigma-Aldrich), l'UII (10^{-7} – 10^{-13} M, Plate-forme en imagerie cellulaire de Haute-Normandie, PRIMACEN, Mont-Saint-Aignan), l'URP (10^{-7} – 10^{-13} M, PRIMACEN), le palosuran (10^{-6} M, MTA, Actélion Pharmaceuticals, Allschwil, Suisse) et l'[Orn⁵]-URP (10^{-6} M, PRIMACEN) sont dilués dans la solution extracellulaire et administrés *via* un système de perfusion par gravité (débit, 2 mL/min). La dynamique du système est telle que le milieu environnant la cellule est renouvelé en moins d'une seconde. Le GDP-β-S (10^{-4} M, Sigma-Aldrich), le BAPTA (10^{-4} M, Sigma-Aldrich), le *dynamin inhibitory peptide* (DIP, 10^{-5} M, Sigma-Aldrich), la staurosporine (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), la quercetine (10^{-5} M, Sigma-Aldrich) et le cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (100 fois dilué, Sigma-Aldrich) sont dilués dans la solution intracellulaire. La composition des solutions intra- et extracellulaire est présentée dans le Tableau 13.

4.5. Analyse des données électrophysiologiques

L'amplitude des dépolarisations/courants et les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant chlore ont été obtenues à l'aide du module d'analyse Clampfit de pClamp 8 (Axon Instruments).

5. Mesures des variations de la concentration cytosolique de calcium

5.1. Flexstation

Les variations de la $[Ca^{2+}]_c$ sont déterminées par mesure de fluorescence grâce à un automate de criblage moyen débit (Flexstation II, PRIMACEN) piloté par le logiciel SoftMax Pro 4.7 (Molecular Devices, Saint Grégoire, France). Les cellules en culture sont dissociées par un mélange trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich), transfectées par nucléofection et ensemencées à raison de 50.10^3 cellules/puits dans des plaques de 96 trous noirs à fond clair (Corning Costar, Brumath, France) en présence de 100 µL de milieu de culture puis incubées 24 h en atmosphère humide à 37°C et à 5% de CO₂. L'auto-fluorescence est tout d'abord mesurée en remplaçant le milieu de culture par 200 µL de tampon HBSS (CaCl₂, 1,3 mM ;

MgCl₂, 0,5 mM ; MgSO₄, 0,4 mM ; KCl, 5,3 mM ; KH₂PO₄, 0,4 mM ; NaHCO₃, 4,2 mM ; NaCl, 137,9 mM ; Na₂HPO₄, 0,4 mM ; D-glucose, 5,6 mM ; Invitrogen) contenant 5 mM d'HEPES et 2,5 mM de probénécide (Sigma-Aldrich) diluée dans une solution de NaOH 0,5 mM. Les cellules sont ensuite incubées 1 h en présence de 40 µL/puits du même tampon HBSS contenant la sonde fluorescente Fluo-4 AM (2 µM, Molecular Devices) et 0,25 µL/mL d'acide pluronique (Molecular Devices). Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec 150 µL de tampon et incubées 10 min avec 200 µL de tampon avant la lecture de la fluorescence. Les différentes solutions de peptides sont disposées dans une plaque 96 puits à fond conique, à des concentrations de 5.10⁻⁷ à 5.10⁻¹³ M. Un volume de 50 µL/puits est injecté 17 secondes après le début de la mesure de fluorescence qui se prolonge jusqu'à un temps total de lecture de 100 à 120 secondes. Les paramètres suivants sont utilisés : excitation, $\lambda_{\text{ex}} = 475$ nm ; émission, $\lambda_{\text{ém}} = 525$ nm ; vitesse d'injection = 26 µL/sec ; hauteur de pipette équivalente à un volume de 100 µL. Les données brutes collectées sont exportées depuis SoftMax Pro pour être traitées avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad software, La Jolla, Etats-Unis).

5.2. Imagerie dynamique – Système MétaFluor

Les variations de la [Ca²⁺]_c dans les lignées CHO-UT co-transférées par les ADNc codant les sous-unités α_2 , β_3 et γ_2 du récepteur GABA_A ont également été mesurées à l'aide d'un système d'imagerie dynamique couplé au poste d'électrophysiologie. Ce système à l'avantage de *i*) suivre l'évolution de la [Ca²⁺]_c sur cellule unique et *ii*) permettre de coupler, en temps réel et sur la même cellule, la mesure des flux calciques aux enregistrements électrophysiologiques. Le système se compose d'une caméra *Cool Digital* (Roper Scientific) et d'un boîtier d'excitation avec roue de filtres (Solent Scientific). Le logiciel MétaFluor (Roper Scientific) développé par *Universal Imaging* permet de faire l'acquisition d'images et de séquences d'images (*time lapse*) en contraste interférentiel ou après excitation de fluorochromes, à une longueur d'onde et pour une durée définie par l'expérimentateur.

L'évolution de la [Ca²⁺]_c des cellules a été suivie à l'aide de la sonde ratiométrique double excitation/mono émission Fura-2 ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{libre}} = 380$ nm, $\lambda_{\text{ex}}^{\text{liée}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{ém}} = 510$ nm ;

Molecular Devices), dérivée du chélateur de calcium EGTA. La liaison du calcium avec la sonde entraîne un déplacement du spectre d'excitation (380 nm → 340 nm) qui se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence. Les cellules sont incubées (37°C, 5% de CO₂, 30 min) dans 500 µL de tampon HBSS contenant 5 mM d'HEPES, 2,5 mM de probénécide diluée dans une solution de NaOH 0,5 mM, la sonde fluorescente Fura-2 AM (2 µM) et 0,25 µL/mL d'acide pluronique. Lors des protocoles d'enregistrements électrophysiologiques simultanés, la sonde Fura-2 (2 µM) est également ajoutée à la solution intracellulaire afin d'éviter la dialyse intracellulaire de la sonde en configuration « cellule-entièvre ». Les enregistrements sont réalisés avec une solution extracellulaire de patch-clamp adaptées aux lignées (Tableau 13).

Les images λ_{380} et λ_{340} sont recueillies toutes les 2 secondes pendant 1 minute puis chaque seconde pendant 15 secondes (temps d'exposition = 150 ms, gain = 1, *binning* = 2). Les composés à tester sont ensuite perfusés et la fluorescence est mesurée chaque seconde pendant 30 secondes. Après rinçage, l'évolution de la fluorescence est suivie chaque seconde pendant 2 minutes puis toutes les 2 secondes jusqu'à 30 minutes d'enregistrement. Le logiciel MétaFluor est équipé d'un module d'analyse qui calcule le ratio sonde liée/sonde libre ($\lambda_{340}/\lambda_{380}$) et permet ainsi de générer un graphique de l'évolution de la fluorescence dans une ou plusieurs régions d'intérêt définies par l'expérimentateur. Les données sont ensuite exportées sous le logiciel Excel afin d'être moyennées et analysées.

6. Microphotographies des cultures primaires – Système MétaMorph

Les mono-cultures et co-cultures ont été observées à 1, 3 et 6 jours *in vitro* à l'aide d'un système de vidéo-imagerie (PRIMACEN) qui se compose d'un microscope inversé Leica DMRB relié à une caméra *Cool Digital* (Roper Scientific), équipé d'une chambre thermostatée à 37°C (Solent Scientific) maintenue à 5% de CO₂. Le logiciel MetaMorph (Roper Scientific) développé par Universal Imaging permet de faire l'acquisition d'images et de séquences d'images (*time lapse*) en contraste interférentiel ou après excitation de fluorochromes.

7. Mesure du métabolisme des polyphosphoinositides

L'effet de l'UII, du GABA ou de l'isoguvacine sur le métabolisme des PIPs est mesuré en utilisant un protocole mis au point au laboratoire (Desrues *et al.*, 1990). Les cultures secondaires (80% de confluence) sont rincées 3 fois au PBS (150 mM, pH = 7,4 ; Sigma-Aldrich) et incubées (2 h, 37°C, 5% CO₂) en présence ou absence d'UII ou d'URP (100 nM) dans un milieu dépourvu de SBF, d'insuline et de glucose, et contenant du *myo*-[³H]inositol (10 µCi/mL, PerkinElmer, Boston, MA, Etats-Unis). Les cellules sont ensuite récupérées à l'aide d'un grattoir dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA, 10%, 4°C) et homogénéisées par sonication. Les inositol phosphates sont séparés de la fraction membranaire par centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C). Les PIPs sont extraits par un mélange chloroforme/éthanol (2:1, v/v ; 4°C) et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur LKB 1217 Rack Beta (EG et G Wallac, Evry, France).

8. Mesure de la formation d'AMPc

En vue de rechercher l'effet des agonistes du récepteur GABA_A sur la formation d'AMPc induite par l'UII, nous avons étudié les variations de la production d'AMPc par des astrocytes corticaux de Rat. Les cultures secondaires (80% de confluence) sont rincées 3 fois au PBS (150 mM, pH = 7,4) et pré-incubées (30 min, 37°C, 5% CO₂) dans 200 µL de milieu dépourvu de serum et contenant un inhibiteur de phosphodiestérases, l'isobutylméthyl-xanthine (IBMX, 10⁻⁴ M). Les cellules sont ensuite incubées (20 min, 37°C, 5% CO₂) dans 200 µL de la même solution en présence ou absence d'UII (1 µm – 10 pM) et/ou de GABA ou d'isoguvacine (10⁻⁴ M, chacun). La réaction est stoppée en retirant le milieu et en ajoutant 200 µL de TCA (10%, 4°C). Les cellules sont ensuite récupérées à l'aide d'un grattoir, homogénéisées par sonication, et centrifugées (10 000 g, 10 min, 4°C) afin d'éliminer la fraction membranaire. Le surnageant est rincé 3 fois par une solution d'éther saturée en eau et placé pour évaporation pendant la nuit au SpeedVac (Savant AES 2000, GMI, Minneapolis, Etats-Unis). Les échantillons sont resuspendus dans 1 mL de tampon acétate (50 mM, pH = 5,8), et la concentration d'AMPc contenue dans chaque puits est déterminée à l'aide

d'un kit commercial de dosage radioimmunologique (RPA 509, Amersham Biosciences). Le seuil de sensibilité est de 15 fmoles/tube.

9. Immunocytochimie et immunohistochimie

L'expression de l'UT et des différentes sous-unités du récepteur GABA_A a été étudiée sur *i)* des cultures astrocytes/neurones et *ii)* des tranches organotypiques flottantes de cervelet de rats âgés de 8 jours. Des expériences menées sur la lignée cellulaire CHO, transfectée par les ADNc codant l'UT^{HA} humain et les sous-unités α_2 , β_3^{c-myc} et/ou γ_2^{c-myc} du récepteur GABA_A humain, ont permis d'étudier plus précisément la répartition cellulaire des deux récepteurs et l'internalisation du récepteur GABA_A, consécutives à l'application d'isoguvacine et/ou d'UII. L'immunomarquage a été réalisé selon la technique d'immunofluorescence indirecte : un anticorps primaire permet d'abord de localiser un antigène exprimé dans un tissu ou une cellule, puis un anticorps secondaire dirigé contre une espèce donnée et couplé à un fluorochrome reconnaît spécifiquement le premier anticorps de cette espèce. La fluorescence est ensuite détectée par microscopie confocale. Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages sont indiqués dans le Tableau 14.

9.1. Protocoles d'immunocytochimie

9.1.1. Expression de l'UT et du récepteur GABA_A dans les co-cultures astrocytes/neurones

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre. Après rinçage au PBS, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA, 4%, RT, 10 min) puis rincées 3 fois au PBS. Une étape facultative de perméabilisation des cellules (RT, 5 min) avec une solution contenant 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) permet aux anticorps d'accéder aux compartiments intracellulaires. Après rinçage au PBS, les sites de liaison non-spécifique sont bloqués par une solution de PBS contenant 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich) et du sérum de Chèvre ou d'Âne dilué au 1/50^{ème} (NGS, *Normal Goat Serum* ou

Anticorps	Espèce	Fournisseur	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
			Immunocytochimie	Immunohistochimie
Anticorps Primaires				
Anti-UT (E18)	Chèvre	Tébu-Bio	1	1
Anti-UT (P15)	Chèvre	Tébu-Bio	1	1
Anti-UT (M250)	Lapin	Tébu-Bio	1	1
Anti-GFAP	Lapin	Dako	2,9	2,9
Anti-GFAP	Souris	Sigma-Aldrich	0,2	0,2
Anti-NeuN	Souris	Tébu-Bio	1	0,5
Anti-S100 β	Souris	Sigma-Aldrich	–	0,5
Anti-Doublecortine	Chèvre	Tébu-Bio	–	0,5
Anti-Calbindin	Souris	Sigma-Aldrich	–	1
Anti- γ_1	Lapin	Dr. W. Sieghart	0,05	0,1
Anti- γ_2	Lapin	Dr. W. Sieghart	0,05	0,1
Anti-HA	Lapin	Tébu-Bio	0,5	–
Anti-c-myc	Souris	Tébu-Bio	0,5	–
Anticorps Secondaires				
Anti-Lapin	Âne	Tébu-Bio	0,5	0,5
Anti-Souris	Âne	Tébu-Bio	0,5	0,5
Anti-Chèvre	Âne	Tébu-Bio	0,5	0,5

Tableau 14 : Anticorps utilisés pour les immunomarquages.

NDS, *Normal Donkey Serum*, RT, 1 h). Les cellules sont ensuite incubées en présence des anticorps primaires dilués dans une solution de PBS/NDS ou PBS/NGS (4°C, 12 h). Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées (RT, 2 h) avec les anticorps secondaires couplés à l’Alexa-488 ou à l’Alexa-594. Puis les cellules sont rincées et leur noyau marqué à l'aide d'une solution de DAPI (2 $\mu\text{g/mL}$, RT, 2 min, Sigma-Aldrich). Après rinçage, les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'une solution de Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne).

9.1.2. Localisation subcellulaire de l'UT et du récepteur GABA_A dans la lignée CHO

Les distributions membranaire et intracellulaire des deux récepteurs ont été étudiées sur des cellules CHO, co-transfектées par les ADNC codant l'UT^{HA} et les sous-unités α_2 , β_3 et $\gamma_2^{c\text{-myc}}$ du récepteur GABA_A. Les cellules ont été traitées avec l'isoguvacine (10^{-4} M, 30 min) et/ou l'UII (10^{-8} M, 30 min). Le protocole d'immunomarquage est identique à celui décrit précédemment. Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre les épitopes HA et c-myc de l'UT et de la sous-unité β_3 du récepteur GABA_A, respectivement. Les anticorps secondaires anti-Lapin couplé à l'Alexa-488 et anti-Chèvre couplé à l'Alexa-594 ont permis de révéler la localisation de l'UT et du récepteur GABA_A, respectivement. Les images obtenues par microscopie confocale sont ensuite analysées à l'aide du logiciel *Leica Confocal Software* (cf § 9.3).

9.1.3. Internalisation du récepteur GABA_A

La capacité des ligands de chacun des deux récepteurs à induire l'internalisation du récepteur GABA_A a été étudiée grâce à un protocole permettant de révéler consécutivement les récepteurs GABA_A présents à la membrane et ceux internalisés, sur des cellules CHO co-transfектées par les ADNC codant l'UT et les sous-unités α_2 , $\beta_3^{c\text{-myc}}$ et γ_2 du récepteur GABA_A. Après rinçage du milieu de culture au PBS froid, qui permet de stopper l'internalisation des récepteurs, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre l'épitope c-myc de la sous-unité γ_2 (15°C , 2 h). Les cellules sont ensuite rincées puis traitées avec l'isoguvacine (10^{-4} M) et/ou l'UII (10^{-8} M) à 37°C et à 5% de CO₂ pendant 30 min. Après rinçage au PBS froid, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de PFA 4% (RT, 10 min) puis rincées à nouveau au PBS. Les sites de liaison non-spécifique sont bloqués par une solution de PBS contenant 0,1% de BSA et du NDS dilué au 1/50^{ème} (RT, 1 h), puis les cellules sont incubées en présence d'un anticorps secondaire dirigé contre l'épitope c-myc et couplé à l'Alexa-488, dilué dans une solution de PBS/NDS (RT ; 2 h). Cette première étape permet de révéler les récepteurs GABA_A présents à la membrane

plasmique. Après rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution contenant 0,3% de Triton X-100 (RT, 5 min). Les cellules sont rincées et les sites de liaison non-spécifique bloqués par une solution de PBS contenant 0,1% de BSA et du NDS dilué au 1/50^{ème} (RT, 1 h). Les cellules sont ensuite incubées avec un second anticorps dirigé contre l'épitope c-myc et couplé à l'Alexa-594, dilué dans une solution de PBS/NDS (RT ; 2 h) afin de révéler les récepteurs GABA_A intracellulaires. Après rinçage, les lamelles sont montées sur lame à l'aide d'une solution de Mowiol. Les images obtenues par microscopie confocale sont ensuite analysées à l'aide du logiciel *Leica Confocal Software* (cf § 9.3).

9.2. Protocole d'immunohistochimie

9.2.1. Préparation des tranches organotypiques de cervelet

La préparation des tranches organotypiques se fait à partir de rats âgés de 8 jours. brièvement, les animaux sont décapités et deux courtes incisions sont effectuées entre le bas du crâne et chacune des oreilles. Une autre incision reliant les deux oreilles permet d'ôter la boîte crânienne recouvrant le cervelet. Le cervelet est prélevé à l'aide d'une pince courbe et aussitôt placé dans du PBS (5 min, 4°C). Le vermis est isolé par deux incisions effectuées à l'aide d'un scalpel, débarrassé des méninges et placé sur la base d'un vibratome (VT1000S, Leica), puis immergé dans du PBS maintenu à 4°C. Les tranches sagittales de 180 µm d'épaisseur sont récupérées dans une plaque 24 trous contenant 1 mL de PBS froid. Pour obtenir une meilleure qualité des tranches, les dissections sont effectuées le plus rapidement possible, et avec le minimum de perturbations mécaniques. De plus, pendant la coupe sur le vibratome, à l'aide d'une pipette Pasteur, la tranche est constamment nettoyée de toutes les cellules mortes et substances libérées par le tissu.

9.2.2. Expression de l'UT et du récepteur GABA_A dans les tranches de cervelet

Les tranches organotypiques sont aussitôt fixées à l'aide d'une solution de PFA 4% (RT, 20 min). Après rinçage au PBS, les sites de liaison non-spécifique sont bloqués par une solution de PBS contenant 0,1% de BSA, 0,3% de Triton X-100 et du NDS dilué au 1/50^{ème}

(RT, 1 h), puis les tranches sont incubées en présence des anticorps primaires dilués dans une solution de PBS/NDS (4°C, 12 h). Après rinçage au PBS, les tranches sont incubées (RT, 2 h) avec les anticorps secondaires couplés à l’Alexa-488 ou à l’Alexa-594. Puis les tranches sont rincées 3 fois au PBS et le noyau des cellules marqué à l’aide d’une solution de DAPI (2 µg/mL, RT, 5 min). Après 2 rinçages, les tranches sont montées entre lame et lamelle à l’aide d’une solution de Mowiol puis observées en microscopie confocale après 24 h.

9.3. Acquisition et analyse des images confocales

L’acquisition des images relatives aux expériences d’immunocyto- et d’immunohisto-chimie a été réalisée sur la plate-forme PRIMACEN à l’aide d’un microscope droit Leica TCS SP2 équipé du système AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*) et présentant 8 raies d’excitation (405, 458, 476, 488, 514, 543, 594 et 633 nm). Les acquisitions sont réalisées selon les 3 dimensions x, y et z, à la résolution de 1024x1024 pixels et en mode séquentiel. Pour un fluorochrome donné, chaque image représente la moyenne de 2 balayages pour chaque ligne et de 3 balayages pour l’image entière. Les acquisitions effectuées sur les tranches de cervelet ont également été moyennées sur l’axe z (5 µm en moyenne, une image tous les 0,5 µm).

Les échelles et les profils d’intensité de marquage ont été obtenus grâce au logiciel *Leica confocal software*. Brièvement, après avoir délimité une région d’intérêt (onglet ‘*Quantify*’, ‘*Profile*’ puis ‘*Viewer*’, dans notre cas une ligne droite coupant la cellule au niveau de son cytoplasme, le logiciel calcule l’intensité de la fluorescence pour chaque fluorochrome le long de cette ligne (Figure 20). Les données sont présentées sous forme de graphique (‘*Graphs*’). Les spectres sont exportés sous forme de tableaux (clic droit sur le spectre puis *export*) afin d’être analysés sous le logiciel Excel. Pour les expériences d’internalisation du récepteur GABA_A, le calcul des fractions membranaire et intracellulaire a été réalisé à partir de ces profils d’intensité, en prenant la valeur de l’intensité à la membrane de part et d’autre de la cellule, et la valeur équidistante correspondant à la fraction intracellulaire. Chaque valeur a ensuite été rapportée à l’intensité totale.

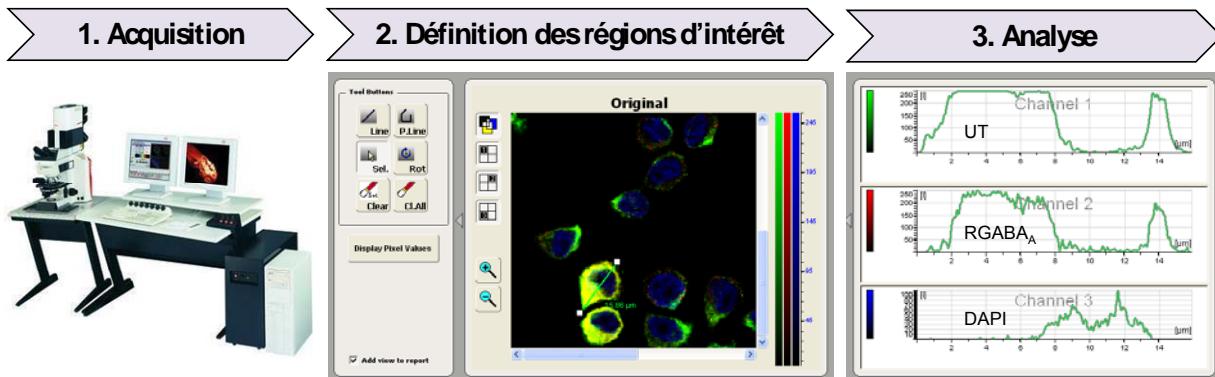


Figure 20 : Analyse subcellulaire du profil d'expression de l'UT et des sous-unités du récepteur GABA_A. Les images sont réalisées et analysées à l'aide du logiciel *Leica Confocal Software*. Dans une première étape (1) l'acquisition des images est réalisée séquentiellement sur un seul plan de coupe, à 488 nm (UT, vert) et à 594 nm (β_3^{HA} , rouge). A partir des images de colocalisation, l'outil *Profile* (onglet *Quantify*) permet de déterminer, le long d'un segment défini (2), le profil d'intensité de chaque fluorochrome (3). Les courbes ainsi obtenues sont exportées et analysées sous le logiciel Excel afin d'étudier, suivant le type d'expérience, l'expression et/ou l'internalisation de l'UT et du récepteur GABA_A (RGABA_A).

10. Synthèse peptidique

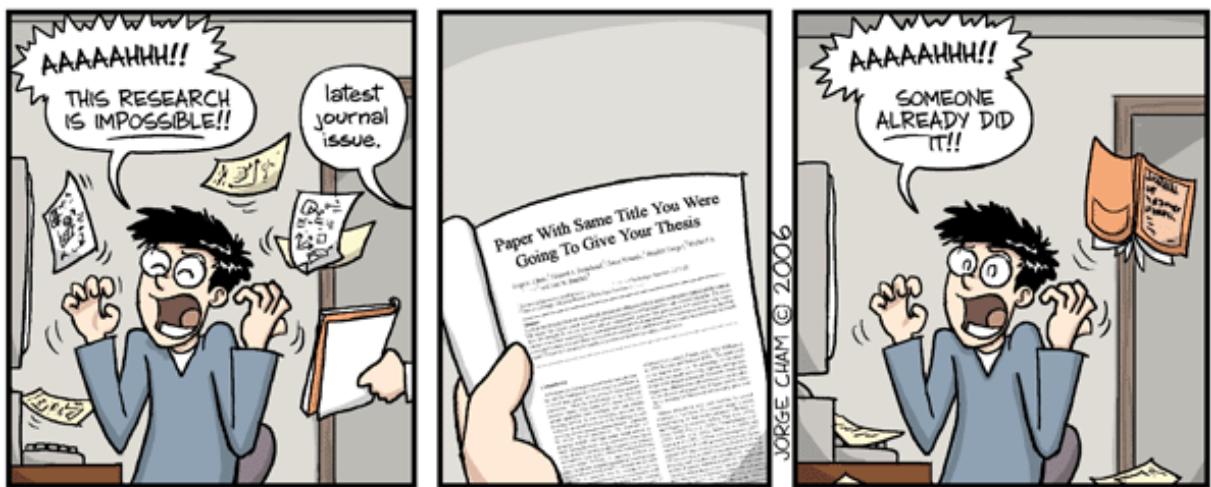
L'UII humaine, l'UII de Rat, l'URP et l'[Orn⁵]-URP ont été synthétisés sur la Plate-forme PRIMACEN. La synthèse des peptides linéaires a été réalisée sur support solide (0,25 mmol), en employant le groupement Fmoc comme protection temporaire de la fonction amine terminale (Wellings & Atherton, 1997), grâce à un synthétiseur automatique de peptides Pioneer® (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) piloté par le logiciel Workstation en suivant les protocoles prédéfinis par le constructeur. Le support utilisé est une résine de type polyéthylène-glycol-polystyrène pré-chargée avec le résidu C_{term} de la séquence d'intérêt. A l'issue de la synthèse, les peptides sont cyclisés par déprotection des résidus cystéine, réalisée par un mélange de 2-mercaptop-éthanol/N,N-dimethylformamide (1:1 ; 5 h). Après filtration et lavages successifs (N,N-dimethylformamide, dichlorométhane et isopropanol) de l'association peptidyl-résine, l'oxydation des cystéines en cystine est menée en présence d'une solution aqueuse de K₃Fe(CN)₆ (0,1 mmol ; 1 mL) pendant 15 heures selon une méthode adaptée de celle décrite par Eritja *et al.* (1987). Puis les peptides sont séparés de la résine par clivage dans une solution d'acide trifluoroacétique/phénol/anisole/H₂O, précipités par l'ajout de *tert*-butylméthyléther, et séchés au dessicateur. L'analyse des peptides clivés et leur purification sont réalisées par chromatographie en phase liquide à haute

performance en phase inverse sur un appareillage modulaire de marque Gilson piloté par le logiciel d'acquisition du constructeur UniPoint (version 1.65). Enfin, les peptides synthétisés sont caractérisés par spectrométrie de masse de type *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF) (Moore, 1997) sur un spectromètre Voyager DE-PRO (Applied Biosystems).

11. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism4 (GraphPad, San Diego, CA, Etats-Unis). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Suivant le type d'expérience et le nombre d'échantillons, les données ont été traitées à l'aide des tests non-paramétriques de Mann et Whitney, de Wilcoxon, de Kruskal et Wallis ou de Friedman.

Résultats



Résultats —

Article I :

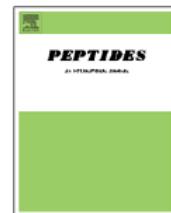
Effect of GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes

Laurence Desrues, Thomas Lefebvre, Mickaël Diallo, Pierrick Gandolfo, Jérôme Leprince, David Chatenet, Hubert Vaudry, Marie-Christine Tonon and Hélène Castel

Peptides (2008) **29**:727–734

Nous avons démontré, dans les astrocytes corticaux de Rat en culture, l'existence de deux voies de couplage distinctes associées à l'UT, *i.e.* G_q/PLC/PIP_s et G_s/AC/AMPc. La stimulation de la PKA consécutive à l'activation de l'AC permettrait un changement de couplage de l'UT, d'une protéine G_s à une protéine G_i, et une meilleure affinité de l'UT pour la protéine G_q. L'UII entraîne ainsi, à faible concentration (< 1 nM), une stimulation de la synthèse d'AMPc, et, à plus forte concentration (> 10 nM), une inhibition de la production d'AMPc et une augmentation du métabolisme des PIP_s. Nous avons observé que l'activation du récepteur GABA_A, par les agonistes GABA ou isoguvacine, inhibe les effets stimulateurs de l'UII sur la production d'AMPc et le métabolisme des PIP_s, un mécanisme associé à une altération du changement de couplage de l'UT.

Ces résultats démontrent pour la première fois l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'UT et le récepteur GABA_A, et suggèrent le rôle d'une plasticité entre un RCPG et un récepteur canal dans la fonction astrocytaire.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Effect of GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes

Laurence Desrues ^{a,b}, Thomas Lefebvre ^{a,b}, Mickaël Diallo ^{a,b}, Pierrick Gandolfo ^{a,b}, Jérôme Leprince ^{a,b}, David Chatenet ^{a,b}, Hubert Vaudry ^{a,b,*}, Marie-Christine Tonon ^{a,b}, Hélène Castel ^{a,b}

^aINSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^bEuropean Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2007

Received in revised form

21 January 2008

Accepted 25 January 2008

Published on line 15 February 2008

Keywords:

Astrocytes

Urotensin II

UT

GABA_AR

cAMP

Polyphosphoinositide

ABSTRACT

Cultured rat cortical astrocytes express two types of urotensin II (UII) binding sites: a high affinity site corresponding to the UT (GPR14) receptor and a low affinity site that has not been fully characterized. Activation of the high affinity site in astroglial cells stimulates polyphosphoinositide (PIP) turnover and provokes an increase in intracellular calcium concentration. We have hypothesized that the existence of distinct affinity sites for UII in rat cortical astrocytes could be accounted for by a possible cross-talk between UT and the ligand-gated ion channel GABA_A receptor (GABA_AR). Exposure of cultured astrocytes to UII provoked a bell-shaped increase in cAMP production, with an EC₅₀ stimulating value of 0.83 ± 0.04 pM, that was totally blocked in the presence of the adenylyl cyclase inhibitor SQ 22,536. In contrast, UII was found to inhibit forskolin-induced cAMP formation. In the presence of the specific PKA inhibitor H89, UII provoked a sustained stimulation of cAMP formation. Inhibition of PKA by H89 strongly reduced the stimulatory effect of UII on PIP metabolism. GABA and the GABA_AR agonist isoguvacine provoked a marked inhibition of UII-induced cAMP synthesis and a significant reduction of UII-evoked PIP turnover. These data suggest that functional interaction between UT and GABA_AR negatively regulates coupling of UT to the classical PLC/IP₃ signaling cascade as well as to the adenylyl cyclase/PKA pathway.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Urotensin II (UII) is a cyclic neuropeptide that was originally isolated from the caudal neurosecretory system of teleost fish [40] and later characterized in amphibians [8] and mammals

[11,12]. A paralog of UII, called urotensin II-related peptide (URP) has been recently isolated [46]. UII and URP share a fully conserved cyclic hexapeptide core (CFWKYC) that carries the biological activity of the peptides [18,26,46]. Both UII and URP are endogenous ligands of a G protein-coupled receptor

* Corresponding author at: INSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. Tel.: +33 235 14 6624; fax: +33 235 14 6946.

E-mail address: hubert.vaudry@univ-rouen.fr (H. Vaudry).

Abbreviations: AC, adenylyl cyclase; [Ca²⁺]_c, cytosolic calcium concentration; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; GABA_AR, gamma-aminobutyric acid type A receptor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid; IBMX, isobutylmethylxanthine; PBS, phosphate buffered saline; PIP, polyphosphoinositide; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptor.

0196-9781/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2008.01.024

(GPCR), termed UT [1,31,46], that is positively coupled to the PLC/PKC signaling cascade through a $G_{q/11}$ protein [38].

The genes encoding UII, URP and UT are all expressed in the central nervous system (CNS) [1,46]. UII mRNA is particularly abundant in motoneurons of the medulla oblongata and spinal cord [11,12,41,42] while UT mRNA is widely expressed in various regions of the CNS including the olfactory system, hippocampus, amygdala, hypothalamus, locus caeruleus, motor nuclei and ventral horn of the spinal cord [24]. Consistent with the widespread distribution of UT in the brain, UII exerts a variety of neurobiological effects. In particular, intracerebroventricular administration of UII increases locomotor activity in trout [27], induces rapid eye movements during sleep wake cycles in rat [23] and provokes anxiogenic-like behavior in mice [35,14]. Central injection of UII also causes hypertension and bradycardia in rat [30], induces chronotropic and inotropic responses in sheep [47] and stimulates prolactin and thyrotropin secretion in rat [22].

Immunohistochemical studies have demonstrated the presence of UT in astroglial cells [6,30]. In cultured rat astrocytes, two distinct types of UII binding sites with high and low affinities have been identified [6]. The high affinity site likely corresponds to UT while the low affinity site has not been fully characterized [6]. We have hypothesized that the two affinity states could be accounted for by cross-talk between UT and other membrane receptors. Indeed, it has been previously observed that, in Aplysia neurons, UII potentiates GABA_A receptor (GABA_AR)-mediated chloride current [44]. Since the GABA_AR is also expressed in glial cells [3–5,19,21], in the present study, we have investigated whether activation of GABA_AR may modify the coupling of UT to its transduction systems in cultured rat astrocytes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Rat UII (UII, pQHGTAPECFWKYCI) was synthesized by the solid phase methodology on a Pioneer PerSeptive Biosystem peptide synthesizer (Applera France, Courtaboeuf, France) using the standard Fmoc procedure as previously described [7,29]. The peptide was purified on a 2.2-cm × 25-cm Vydac C₁₈ column (Alltech, Templiers, France) (>98% pure) and characterized by MALDI-TOF MS on a Voyager DE-PRO mass spectrometer (Applera France). Somatostatin-14 was a gift from Dr I. Fermé (Sanofi-Synthélabo, Le Plessis-Robinson, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), glutamine, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES), the antibiotic-antimycotic solution, Ham-F12 culture medium, insulin, D(+)-glucose, GABA, isoguvacine, H89 dihydrochloride hydrate, SQ 22,536, trypsin-EDTA, forskolin and isobutyl-methylxanthine (IBMX) were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Fetal bovine serum (FBS) was from Eurobio (Courtaboeuf, France). Myo-[³H]inositol (100 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer (Courtaboeuf, France). The cAMP radioimmunoassay kit was from GE Healthcare (Saclay, France).

2.2. Cell culture

Primary cultures of cortical astrocytes were prepared as previously described [20]. Briefly, cerebral hemispheres from newborn Wistar rats were collected in DMEM/Ham-F12 (2/1, v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. The tissues were disaggregated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle, and filtered through a 100-μm pore size mesh filter (Falcon, Becton Dickinson, Grenoble, France). Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and seeded in 150-cm² culture flasks (Falcon) at a density of 20×10^6 cells per flask. The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂) and the medium was changed twice a week. When cultures were confluent, the flasks were gently shaken on an orbital shaker at 250 rpm for 2 h. Dislodged cells were discarded and a second step of purification was performed at 250 rpm for 14–16 h. Remaining adhesive cells were collected by trypsinization, centrifuged (800 rpm, 10 min) and plated in 150-cm² flasks. Suspended astrocytes were harvested and seeded in poly-L-lysine-coated 24-well plates (for the measurement of cAMP production) or in 35-mm dishes (for the measurement of PIPs turnover). The purity of the cultures assessed by counting the percentage of astrocytes immunostained with GFAP antibodies was 99% [6].

2.3. Measurement of cAMP formation

Astrocytes cultured on 24-well plates for 2–4 days were preincubated at 37 °C for 30 min in serum-free medium supplemented with IBMX (0.1 mM) to inhibit phosphodiesterases. The cells were then incubated in the same solution with test substances for 20 min. The incubation was stopped by removing the medium and adding ice-cold 70% ethanol. The cells were homogenized and centrifuged (14,000 rpm, 4 °C, 10 min). The supernatants were collected and evaporated overnight. Finally, dried extracts were resuspended with 50 mM acetate buffer, and the cAMP content per well was measured following the procedure recommended in the cAMP radioimmunoassay kit. The sensitivity threshold of the assay was 15 fmol/tube.

2.4. Measurement of polyphosphoinositide turnover

The effect of UII on polyphosphoinositide (PIP) metabolism was quantified by measuring the incorporation of [³H]inositol into PIPs [13]. Astrocytes cultured on 35-mm dishes for 2–4 days were incubated for 2 h at 37 °C with 10 μCi/ml myo-[³H]inositol in serum-free medium, without glucose-supplementation, in the absence or presence of test substances. The incubation was stopped by removing the medium and adding ice-cold 10% trichloroacetic acid. The cells were homogenized and centrifuged (14,000 rpm, 4 °C, 10 min). The pellet was washed with 500 μl chilled water and [³H]-labeled PIPs were extracted with 500 μl of chloroform/methanol (2/1, v/v). The radioactivity was counted in a beta counter (LKB 1217 Rack Beta, EG and G Wallac, Evry, France).

2.5. Data analysis

For measurements of cAMP production and PIP turnover, values presented in the figures are means \pm S.E.M. Statistical significance of differences was determined by using the Mann-Whitney test.

3. Results

3.1. Effect of UII on cAMP formation in cultured rat astrocytes

Exposure of cultured rat astrocytes to graded concentrations of UII (1 pM to 1 μ M) for 20 min provoked a bell-shaped increase in cAMP production with a maximum response at 10 pM ($173.4 \pm 23.8\%$). The best fit of the stimulating dose-response curve (1 pM–1 nM) yielded an EC_{50} value of 0.83 ± 0.04 pM (Fig. 1A, inset). At higher concentrations (1 nM–1 μ M), the stimulatory effect of UII on cAMP formation gradually declined (Fig. 1A). Incubation of astrocytes for 20 min with the specific adenylyl cyclase (AC) inhibitor SQ 22,536 (0.1 mM), attenuated basal cAMP level and totally suppressed the stimulatory effect of UII on cAMP production (Fig. 1A). In order to investigate whether high concentrations of UII might uncouple UT from its cognate G_s protein through a cAMP-dependent process, cultured astrocytes were exposed to UII in the presence of the AC activator forskolin (10 μ M, 30 min). UII (0.1 nM–1 μ M) provoked a significant inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation (Fig. 1B). In the presence of the specific cell-permeable PKA inhibitor H89 (10 μ M, 20 min), UII induced a concentration-dependent increase of cAMP production that reached a plateau at 0.1 nM and persisted at concentrations up to 1 μ M (Fig. 1C).

3.2. Effect of PKA inhibition on UII-evoked activation of polyphosphoinositide turnover in cultured rat astrocytes

Incubation of astrocytes with graded concentrations of UII (1 pM–1 μ M) resulted in a biphasic dose-dependent stimulation of the incorporation of [³H]inositol into the PIP fraction yielding an EC_{50}^1 value of 4.0 ± 0.1 pM and EC_{50}^2 value of 30.0 ± 0.1 nM (Fig. 2A). At the concentration of 100 nM, UII evoked a maximum stimulatory effect of $143 \pm 4\%$ on PIP turnover. The opposite effects of UII on basal and forskolin-induced cAMP production led us to hypothesize that an exchange coupling of UT from G_s to G_i may modify the UT-associated G_q efficiency in a PKA-dependent manner. Addition of H89 (10 μ M, 2 h) in the incubation medium markedly reduced the UII-evoked increase of [³H]PIP formation (Fig. 2B).

3.3. Effect of GABA_AR activation on UII-induced stimulation of cAMP and PIP formation

A possible regulation of these UT-associated transduction pathways by GABA_AR was investigated. GABA (10 μ M) totally suppressed the stimulatory effect of UII (0.1 nM–1 μ M) on cAMP formation (Fig. 3A). Similarly, the GABA_AR agonist isoguvacine (10 μ M) markedly reduced UII-evoked cAMP formation (Fig. 3A). Somatostatin-14 (SRIF, 10 nM), which

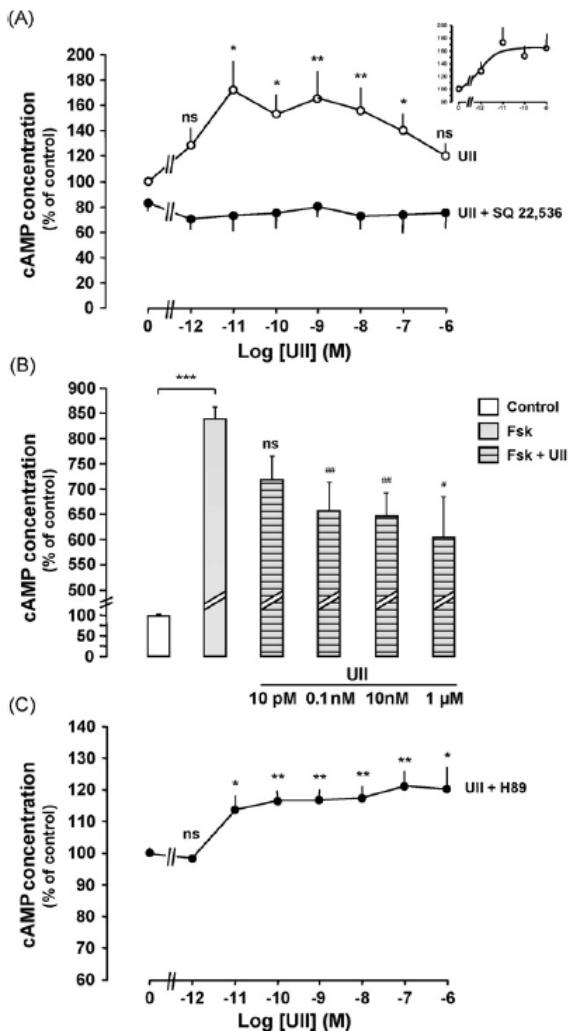


Fig. 1 – Effect of UII on cAMP formation in cultured rat cortical astrocytes. (A) Cells were incubated for 20 min with graded concentrations of UII (1 pM to 1 μ M) in the absence (○) or presence (●) of the adenylyl cyclase inhibitor SQ 22,536 (0.1 mM). The inset represents the best sigmoidal fit of the dose-response curve corresponding to the stimulatory effect of UII (1 pM to 1 nM). (B) After a 30-min pre-incubation with forskolin (Fsk, 10 μ M), cells were incubated for 20 min with graded concentrations of UII (10 pM, 0.1 nM, 10 nM and 1 μ M). (C) Cells were incubated for 20 min with graded concentrations of UII (1 pM to 1 μ M) in the presence of H89 (10 μ M). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of UII. Data are mean \pm S.E.M. of 2–5 independent experiments performed in triplicate. ns, not statistically significant; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared to the control value; #P < 0.05, ##P < 0.01 compared to the respective value in the presence of forskolin (Mann-Whitney test).

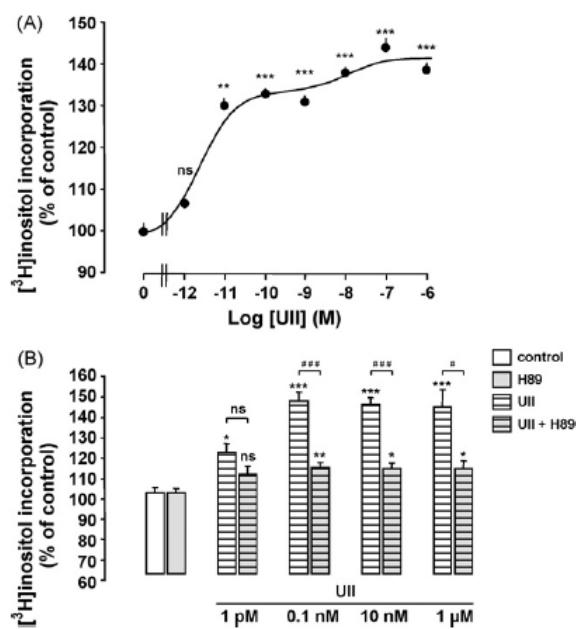


Fig. 2 – Effect of UII on polyphosphoinositide turnover in cultured rat cortical astrocytes. (A) Cells were incubated with [³H]-inositol for 2 h in the presence of graded concentrations of UII (1 pM to 1 μM). **(B)** Cells were incubated with [³H]-inositol for 2 h in the absence or presence of graded concentrations of UII (1 pM, 0.1 nM, 10 nM and 1 μM) without or with the PKA inhibitor H89 (10 μM). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of UII (A, B) or H89 (B). Data are mean ± S.E.M. of 3–4 independent experiments performed in triplicate. ns, not statistically significant; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared to the control value; #P < 0.05, ##P < 0.001 compared to the respective value in the absence of H89 (Mann–Whitney test).

exhibits sequence similarities with UII and displaces [¹²⁵I]UII at micromolar concentrations [6], significantly attenuated by 30.8% and 45.6% basal and forskolin-induced stimulation of cAMP formation, respectively (Fig. 3B). Concomitant administration of SRIF and isoguvacine (10 μM) affected neither basal nor SRIF-evoked inhibition of cAMP synthesis (Fig. 3B). A dose-response curve revealed that the maximum effect of isoguvacine on cAMP formation was observed at a concentration of UII of 10 pM (Fig. 3C). In addition, isoguvacine significantly increased the IC₅₀ value of the UII dose-response curve from 5.3 ± 0.2 pM to 18 ± 9 pM (Fig. 3C, inset).

The possible involvement of GABA_AR activation in the UT/G_q-associated transduction pathway was then assessed. GABA and isoguvacine (10 μM each) significantly attenuated the UII (0.1 nM, 10 nM and 1 μM)-induced [³H]inositol incorporation into PIPs by 45%, 40.9% and 37.5% for GABA and 90.5%, 37% and 53% for isoguvacine (Fig. 4A). A dose-response curve showed that isoguvacine, at concentrations of 10 μM and 0.1 mM, significantly inhibited UII (10 nM)-induced PIP metabolism (Fig. 4B).

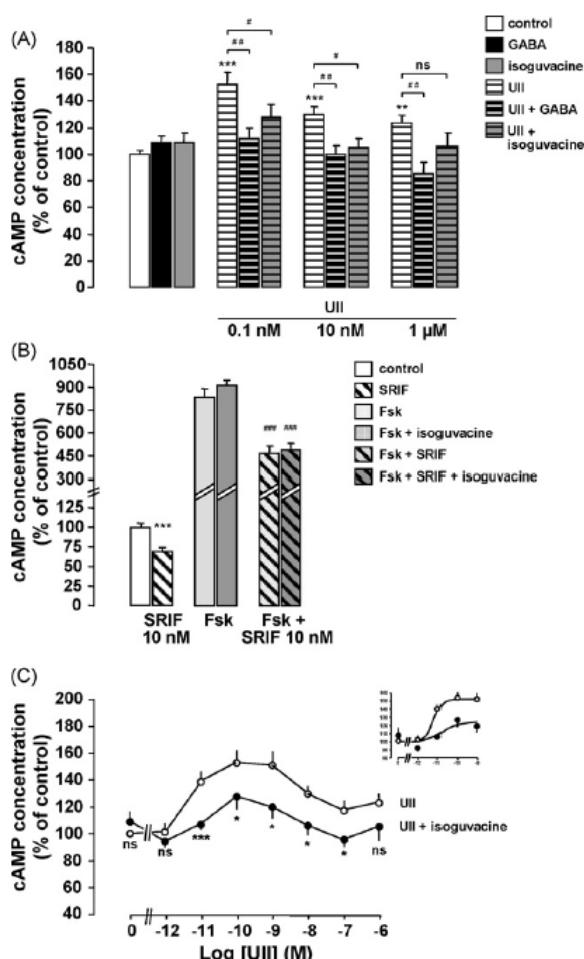


Fig. 3 – Effect of GABA_AR agonists on UII-induced cAMP formation in cultured rat cortical astrocytes. (A) Cells were incubated for 20 min with graded concentrations of UII (0.1 nM, 10 nM and 1 μM) in the absence or presence of GABA (10 μM) or isoguvacine (10 μM). **(B)** Cells were incubated for 20 min with SRIF (10 nM), in the absence or presence of forskolin (Fsk, 10 μM, 30 min) and forskolin-treated cells were exposed to isoguvacine (10 μM) without and with SRIF (10 nM). **(C)** Cells were incubated for 20 min with graded concentrations of UII (1 pM to 1 μM) in the absence (○) or presence (●) of isoguvacine (10 μM). The inset represents the best sigmoidal fit of the dose-response curve corresponding to the stimulatory effect of UII (1 pM to 1 nM) on cAMP formation in the absence (○) or presence (●) of isoguvacine (10 μM). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of UII (A, C) or SRIF (B). Data are mean ± S.E.M. of 2–11 independent experiments performed in triplicate. ns, not statistically significant; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared to control value; #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 compared to the respective value in the absence of SRIF or GABA_AR agonists (Mann–Whitney test).

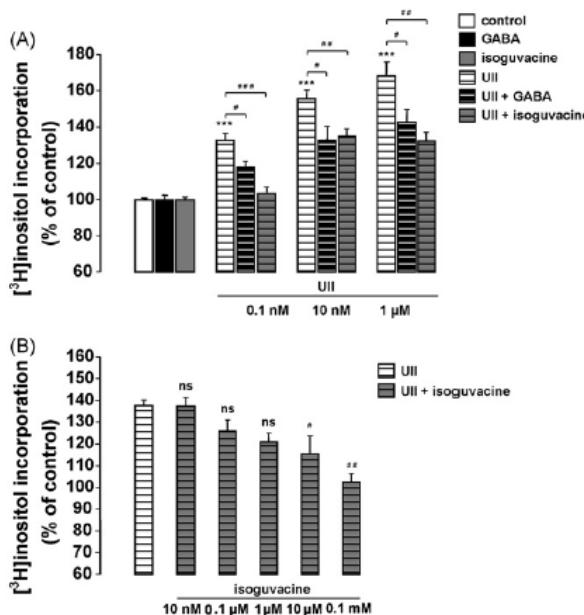


Fig. 4 – Effect of GABA_AR agonists on UII-induced stimulation of polyphosphoinositide turnover in cultured rat cortical astrocytes. (A) Cells were incubated with [³H]-inositol for 2 h in the absence or presence of graded concentrations of UII (0.1 nM, 10 nM and 1 μM), without or with GABA (10 μM) or isoguvacine (10 μM). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of UII or GABA_AR agonists. (B) Cells were incubated with [³H]-inositol for 2 h in the absence or presence of UII (10 nM), without or with isoguvacine (10 nM to 0.1 mM). The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of UII. Data are mean ± S.E.M. of 2–19 independent experiments performed in triplicate. ns, not statistically significant; ***P < 0.001 compared to control value; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 compared to the respective value in the absence of GABA_AR agonists (Mann–Whitney test).

4. Discussion

The UII/URP receptor, UT, is coupled to PLC through a G_{q/11} protein: activation of UT provokes an increase in PIP turnover and a subsequent rise of intracellular calcium concentration [15]. It has been recently shown that, in addition, UT is also capable of activating the PKA pathway in spinal cord neurons [17] and of reducing forskolin-induced cAMP formation in UT-transfected cells [45]. In the present study, we have investigated the effect of GABA_AR activation on the intracellular signaling cascades recruited by UT in rat cortical astrocytes. We show that, at low concentrations, UII stimulates both the G_s/AC/cAMP and G_q/PLC/IP₃ pathways. At higher UII concentrations, UT couples preferentially to a G_q/AC system in addition to the G_q/PLC cascade. Activation of the GABA_AR profoundly alters the UT coupling in rat cortical astrocytes.

Incubation of astrocytes with graded concentrations of UII provoked a bell-shaped stimulation of cAMP formation with an EC₅₀ value in the pM range. The increase in cAMP production induced by UII was suppressed by the specific AC antagonist SQ 22,536, indicating that UT is indeed positively coupled to AC. However, at higher concentrations (>10 nM), the stimulatory effect of UII gradually declined. This observation suggested that cAMP accumulation and PKA activation may induce homologous desensitization of the cAMP response to UII, i.e. a shift of the coupling of UT from G_s to G_i. In support of this hypothesis, we found that (i) UII inhibited forskolin-evoked cAMP formation and (ii) the PKA inhibitor H89 prevented the attenuation of the cAMP response to high concentrations of UII. These data indicate that UT is coupled to a G_s/AC transduction pathway whose activation causes an exchange towards coupling to a G_i/AC cascade through a PKA-dependent mechanism. A similar observation has been recently reported in UT-transfected CHO cells in which UII inhibits forskolin-evoked cAMP formation [45].

Dual coupling of other GPCRs, such as β₂-adrenergic and serotonergic receptors, to G_s and G_i has already been reported in cardiac myocytes [25,48]. Specific Ser/Thr clusters in the C-terminal tails of these receptors may serve as the primary site for agonist-induced receptor phosphorylation [39]. Lawler et al. have demonstrated that PKA phosphorylation of the Ser³⁵⁷ residue of the G_s-associated prostacyclin receptor, favors its coupling to G_{αi}, leading to inhibition of AC [28]. Analysis of the primary sequence of rat UT revealed the presence of a critical PKA-dependent phosphorylation site at Ser³⁴⁰, in the C-terminal domain of the receptor, which is likely involved in the G_s to G_i exchange coupling in astrocytes.

There is now increasing evidence that activation of various GPCR can simultaneously recruit AC and PLC. For instance, M4 muscarinic, somatostatin and opioid receptors that are negatively coupled to AC, are also positively coupled to PLC [36,37]. The present study has demonstrated that UT, expressed in astrocytes, is associated to the AC/PKA as well as to the PLC/PKC pathways. The stimulating dose-response curve of UII on PIP exhibits a biphasic profile, with a second component around 30 nM. The rebound stimulation of PIP turnover detected in the second phase of the curve, occurs precisely at UII concentrations responsible for the gradual fading of cAMP formation. Moreover, we observed that the PKA inhibitor H89 markedly reduced the stimulatory effect of UII on PIP metabolism. Thus, the ability of UII to stimulate PLC activity can be accounted for at least in part to the PKA-dependent G_s to G_i exchange coupling of UT. It can be hypothesized that high level of receptor activation leads to a potentiation of the PLC activity via a mechanism involving a PKA-dependent phosphorylation of UT. In support of this hypothesis, it has been recently shown that a deletion of up to 50 residues containing many potential phospho-acceptor receptor sites in the cytoplasmic domain of UT, reduces the ability of UII to stimulate IP₃ formation [43]. We thus propose that the UT/G_q/G_s system induces cAMP accumulation and PKA activation which in turn enhances receptor affinity towards G_i protein, and amplifies UT coupling to the G_q/PLC transduction cascade.

Receptor cross-talk and oligomerization have been shown to modify several aspects of receptor function including ligand binding and G protein coupling [2]. The biphasic displacement

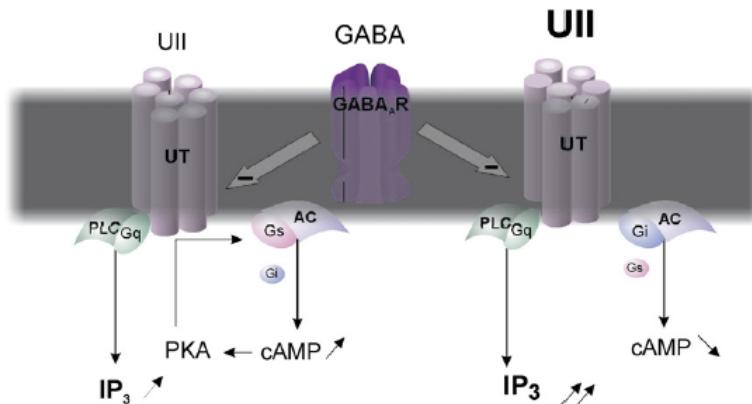


Fig. 5 – Proposed model depicting the possible mechanism by which GABA_AR activation may modulate the coupling of UT to its signaling pathways in rat cortical astrocytes. At low concentrations, UII, acting through UT, activates both the G_s/AC/cAMP/PKA and G_q/PLC/PIP signaling pathways. Activation of PKA provokes a decreased affinity for G_s and an increased affinity for G_i proteins. Thus, at high concentrations, UII still stimulates PIP turnover but inhibits cAMP formation so that activation of GABA_AR attenuates UII-induced cAMP formation and PIP turnover.

curve observed with UII on cultured astrocytes [6] may thus be ascribed to different functional states of UT regulated by its possible interaction with other membrane receptors. The present data revealed that, in cultured rat astrocytes, GABA and the specific GABA_AR agonist isoguvacine strongly reduced the stimulation of cAMP formation evoked by UII, without affecting basal cAMP level. The dose-response curve of UII on cAMP contents performed in the presence of isoguvacine, showed that GABA_AR activation markedly lowered the affinity and efficacy of UT coupling to AC. Besides UT, astroglial cells also express several variants of somatostatin receptors, including sst1, sst2 and sst4 [16,34] which exhibit a high degree of sequence identity with UT [33]. In fact, a recent study has shown that UII and URP can activate the somatostatin receptors sst2 and sst5 [32]. However, we found that isoguvacine did not modify the ability of somatostatin to depress forskolin-induced cAMP formation in rat astrocytes, indicating that GABA_AR activation specifically affects UT but not somatostatin receptor coupling to AC. Similarly to what was observed on UII-evoked cAMP synthesis, GABA and the GABA_AR agonist isoguvacine also reduced the UII-mediated increase in PIP turnover. The maximum inhibition was detected at UII concentrations in the pM range which induce stimulation of cAMP formation. Thus, GABA_AR exerts its negative control specifically on the UT/G_q/G_s system, reduces the PKA-dependent G_s to G_i UT exchange coupling and, as a consequence, inhibits the rebound stimulation of PIP metabolism. These observations suggest that efficient coupling of UT to G proteins is regulated either through a direct cross-talk with GABA_AR, or through a more distant mechanism involving GABA_AR-associated chloride efflux responsible for calcium entry via voltage-activated calcium channels. Consistent with this latter hypothesis, it has been previously shown that activation of GABA_AR causes opening of voltage-dependent calcium channels in hippocampal astrocytes [19] and that calcium entry may negatively regulate AC types V or VI activity and cAMP formation [9,10].

In conclusion, the present study has shown that, in cultured rat astrocytes, UII binding causes positive coupling of UT to both the G_q/PLC and G_s/AC pathways. PKA stimulation provokes a switch of UT coupling from G_s to G_i and a potentiation of UT coupling to G_q. Activation of the GABA_AR negatively regulates the UT/G_s and UT/G_q couplings (Fig. 5). These data provide the first evidence that UT function can be regulated by a ligand-gated ion channel receptor.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Mrs Huguette Lemonnier and Mr Gérard Cauchois for skilful technical assistance. This work was supported by INSERM (U413), the European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), the Regional Platform for Cell Imaging (PFRICHN) and the Conseil Régional de Haute-Normandie. T.L. was recipient of a fellowship from INSERM and the Conseil Régional de Haute-Normandie, and M.D. was recipient of a fellowship from the LARC-Neuroscience network and the Conseil Régional de Haute-Normandie.

REFERENCES

- [1] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282–6.
- [2] Bai M. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* 2004;16:175–86.
- [3] Bormann J, Kettenmann H. Patch-clamp study of γ -aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9336–40.
- [4] Bovolin P, Santi MR, Puia G, Costa E, Grayson D. Expression pattern of γ -aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and

- astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9344–8.
- [5] Bureau M, Laschet J, Bureau-Heeren M, Hennuy B, Minet A, Wins P, et al. Astroglial cells express large amounts of GABA_A receptor proteins in mature brain. *J Neurochem* 1995;65:2006–15.
- [6] Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, et al. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 2006;99:582–95.
- [7] Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boulanan C, Carlier L, Ségalas-Milazzo I, et al. Structure-activity relationships on structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 2004;25:1819–30.
- [8] Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, Vaudry H. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:578–83.
- [9] Cooper DM, Mons N, Karpen JW. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 1995;374:421–4.
- [10] Cooper DMF. Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylyl cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* 2003;31:912–5.
- [11] Coulouarn Y, Lührmann I, Jégou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15803–8.
- [12] Coulouarn Y, Jégou S, Tostivint H, Vaudry H, Lührmann I. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 1999;457:28–32.
- [13] Desrues L, Tonon MC, Vaudry H. Thyrotrophin-releasing hormone stimulates polyphosphoinositide metabolism in the frog neurointermediate lobe. *J Mol Endocrinol* 1990;5:129–36.
- [14] Do-Rego JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, et al. Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology* 2005;183:103–17.
- [15] Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:76–85.
- [16] Feindt J, Becker I, Blomer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, et al. Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* 1995;65:1997–2005.
- [17] Filipeanu CM, Brailoiu E, Le Dun S, Dun NJ. Urotensin-II regulates intracellular calcium in dissociated rat spinal cord neurons. *J Neurochem* 2002;83:879–84.
- [18] Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T. Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* 2002;45:1799–805.
- [19] Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA. GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 1995;15:2720–32.
- [20] Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H, Tonon MC. The stimulatory effect of the octadecapeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 1997;322:275–81.
- [21] Gandolfo P, Patte C, Thoumas JL, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC. The endozepine ODN stimulates [³H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology* 1999;38:725–32.
- [22] Gartlon J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, et al. Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;155:426–33.
- [23] Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, et al. Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* 2005;25:5465–74.
- [24] Jégou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, et al. Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2006;495: 21–36.
- [25] Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, et al. Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res* 2000;87:705–9.
- [26] Labarrère P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, et al. Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003;18:77–88.
- [27] Lancien F, Leprince J, Mimassi N, Mabin D, Vaudry H, Le Mével JC. Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* 2004;1023:167–74.
- [28] Lawler OA, Migglin SM, Kinsella BT. Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem* 2001;276:33596–607.
- [29] Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchere JL, Vaudry H, et al. Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecapeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J Med Chem* 1998;41:4433–8.
- [30] Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, et al. Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2003;26:839–45.
- [31] Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams Jr DL, et al. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:174–8.
- [32] Malagon MM, Molina M, Gahete MD, Duran-Prado M, Martinez-Fuentes J, Tonon MC, et al. Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtype 2 and 5. *Peptides* 2008;29:711–20.
- [33] Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, et al. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995;29:335–44.
- [34] Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H, et al. Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem* 2005;94:561–71.
- [35] Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, et al. Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* 2004;358:99–102.
- [36] Murthy KS, Coy DH, Makhlouf GM. Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-β3 by G_{βγ} and inhibition of adenylyl cyclase by G_{αi1} and G_{αo}. *J Biol Chem* 1996;271:23458–63.
- [37] Murthy KS, Makhlouf GM. Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Mol Pharmacol* 1996;50:870–7.

- [38] Nothacker HP, Clark S. From heart to mind. The urotensin II system and its evolving neurophysiological role. *FEBS J* 2005;272:5694–702.
- [39] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 2001;276:19452–60.
- [40] Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, et al. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5021–4.
- [41] Pelletier G, Lihrmann I, Vaudry H. Role of androgens in the regulation of urotensin II precursor mRNA expression in the rat brainstem and spinal cord. *Neuroscience* 2002;115:525–32.
- [42] Pelletier G, Lihrmann I, Dubessy C, Luu-The V, Vaudry H, Labrie F. Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 2005;132:689–96.
- [43] Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G, Leduc R. Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalisation. *Biochem J* 2005;385:115–23.
- [44] Sawada M, Ichinose M. Potentiation of GABA(A) receptor-mediated Cl⁻ current by urotensin peptides in identified Aplysia neurons. *J Neurosci Res* 1999;56:547–52.
- [45] Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, et al. Cell and tissue responses of a range of urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;373:148–57.
- [46] Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, et al. Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:860–8.
- [47] Watson AM, Lambert GW, Smith KJ, May CN. Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* 2003;42:373–9.
- [48] Xiao RP. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001;2001:RE15.

Article II :

Tight promiscuity between the GABA_A receptor and the G protein-coupled receptor for urotensin II induces long-term inhibition of the GABAergic activity. Relevance for astrocyte plasticity

Thomas Lefebvre, Laurence Desrues, Céline Lecointre, Mickaël Diallo,
Christophe Dubessy, Jérôme Leprince, Vincent Compère, Pierrick
Gandolfo, Marie-Christine Tonon and Hélène Castel

J. Cell. Biol. (Soumis)

Dans cette étude, nous avons démontré que l'UT et le récepteur GABA_A sont co-exprimés dans les cellules de Purkinje et les prolongements astrocytaires du cervelet de Rat, ainsi que dans les astrocytes en co-culture avec des neurones en grain. Dans ce modèle de co-culture, l'UII inhibe la fonction GABAergique, spécifiquement et avec une très haute affinité, dans les astrocytes. Sur des cellules CHO exprimant l'UT humain et différentes combinaisons en sous-unités du récepteur GABA_A humain, l'UII inhibe l'amplitude du courant chlore dès 10^{-13} M ($\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 > \alpha_2\beta_3\gamma_1 > \alpha_2\beta_1\gamma_1$) et est d'autant plus puissant que la sous-unité γ est associée au complexe GABAergique ($\alpha_2\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_1\gamma_2 \gg \alpha_2\beta_3 \approx \alpha_2\beta_1$). L'effet de l'UII, caractérisé par une inhibition rapide, suivie d'une diminution progressive de l'amplitude du courant au cours du rinçage, n'est pas relayé par les protéines G associées à l'UT. En revanche, l'inhibition observée à long-terme dépend partiellement du calcium, des kinases/phosphatases intracellulaires, et met en jeu la dynamine, une protéine classiquement impliquée dans le processus d'internalisation du récepteur GABA_A. Nous confirmons en effet sur des CHO exprimant l'UT et les sous-unités $\alpha_2\beta_3^{HA}\gamma_2$, que l'UII provoque l'internalisation du récepteur GABA_A. Enfin, l'utilisation de mutants de l'UT ou du peptidomimétique correspondant au domaine C_{term} de l'UT, indique que l'interaction fonctionnelle avec le récepteur GABA_A est relayée par le fragment le plus distal de l'UT.

Ces résultats démontrent que l'activation de l'UT, dans les CHO et les astrocytes, inhibe rapidement la fonction GABAergique, et provoque l'extinction du récepteur GABA_A à la membrane plasmique *via* son internalisation. Les effets rapides de l'UII, partiellement indépendants des voies de signalisation classiquement associées aux RCPG, et conduisant à l'internalisation prolongée et majeure du canal chlore, suggèrent l'existence d'un couplage "direct" entre l'UT et le récepteur GABA_A. De fait, la perte du rôle répresseur du récepteur GABA_A engendrée par le peptide vasoactif UII pourrait jouer un rôle majeur dans la prolifération astrocytaire au cours de lésions cérébrales.

Tight promiscuity between the GABA_A receptor and the urotensin II G protein-coupled receptor induces long-term inhibition of the GABAergic activity.

Relevance for astrocyte plasticity

T. LEFEBVRE^{1,2,3}, L. DESRUES^{1,2,3}, C. LECOINTRE^{1,2,3}, M. DIALLO^{1,2,3}, C. DUBESSY^{1,2,3}, J. LEPRINCE^{1,2,3}, V. COMPÈRE^{1,2,3,4}, P. GANDOLFO^{1,2,3}, M.C. TONON^{1,2,3}, AND H. CASTEL^{1,2,3,*}

¹Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, Astrocyte and Vascular Niche

²European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), Regional Platform for Cell Imaging of Normandy (PRIMACEN)

³University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

⁴Department of Anesthesiology and Critical Care, Rouen University Hospital, France

Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuroendocrine and Neuronal Cell Differentiation and Communication, Astrocyte and Vascular Niche, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr; Tel. (33) 235-14-6630; Fax. (33) 235-14-6946.

Abbreviations:

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; BSA, bovine serum albumin, GDP-β-S, guanosine 5'-[βthio]diphosphate; DMCM, methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate, FBS, fetal bovine serum; EGTA, ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid; BAPTA, (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; DIP, dynamin inhibitory peptide; HA, hemagglutinin; AC, adenylyl cyclase; [Ca²⁺]_c, cytosolic calcium concentration; GABA_{AR}, gamma-aminobutyric acid type A receptor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GPCR, G protein-coupled receptor; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid; Iso, isoguvacine; KIC, Cocktail of kinase and phosphatase inhibitors; NeuN; Neuronal nuclei; NVU, neurovascular niche; PBS, phosphate buffered saline; PIP, polyphosphoinositide; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptor.

Key Words: receptor cross-talk, G protein, UT, GABA_A receptor, calcium, internalization

Abstract

GABA_A receptor (GABA_{AR}) expression levels are correlated with the proliferation rate of astrocytes after stroke or during malignancy of astrocytoma, leading to the non resolved hypothesis that GABA_{AR} expression/activation may work as a cell proliferation repressor. A number of vasoactive peptides exhibit the potential to modulate astrocyte proliferation, and the question whether these mechanisms may imply alterations in GABA_{AR}-mediated functions, and/or plasma membrane densities is open. The vasoactive peptide urotensin II (UII) activates a G protein-coupled receptor named UT, and mediates potent vasoconstricting actions in mammals. We have previously demonstrated that UT/G_q/IP₃ coupling in astrocytes is regulated by the GABA_{AR}. We found that UT and GABA_{AR} are co-expressed in cerebellar glial cells, and that UII inhibited the GABAergic activity in cultured astrocytes. In CHO co-expressing human UT and GABA_{AR} subunits, UII markedly depressed the GABA current ($\beta 3\gamma 2 > \alpha 2\beta 3\gamma 2 > \alpha 2\beta 1\gamma 2$). This effect characterized by a fast short-term inhibition followed by drastic and irreversible run-down, is not relayed by G proteins. The run-down partially involves Ca²⁺ and phosphorylation processes, is mediated by dynamin, and results from GABA_{AR} internalization. Thus, activation of the vasoactive G protein-coupled receptor UT triggers functional inhibition and endocytosis of GABA_{AR} in CHO and astrocytes, *via* its receptor C-terminus. This UII-induced disappearance of the repressor activity of GABA_{AR}, may play a key role in the initiation of astrogliosis.

Running title: urotensin II-induced GABA_{AR} long-term inhibition

Introduction

Integrated brain function and dysfunction arise from the complex interactions between a network of multiple cell types including neurons, astrocytes and the microvascular endothelial cells comprising the cerebral vasculature (Ohab et al., 2006; Takano et al., 2006; Lo and Rosenberg, 2009). This micro-environment is a dynamic structure referred as neurovascular unit (NVU) where polarized astrocytes have a pivotal role, rapidly transducing synaptic information within the NVU *via* their endfeet processes to brain capillaries (Lo and Rosenberg; Abbot et al., 2006). The hemodynamic neurovascular coupling involves specific targets within the neural-glial-endothelial complex (Pelligrino, 2006; Metea and Newman, 2007); in particular metabotropic receptors expressed by astrocytes that can classically couple to the second messenger system IP_3/Ca^{2+} (Salm and McCarthy, 1992; Magistretti et al., 1993; Verkhratsky and Steinhäusern, 2000; Wang and Bordey, 2008). The important action of astrocytes in the control of brain microvasculature raises also the possibility that astrocyte dysfunction would be involved in the misregulation of the NVU in brain pathologies (Iadecola, 1998; Niwa et al., 2000; Iadecola, 2004). In these conditions, astrogliosis reactivity is characterized by proliferation, hypertrophy, process extension, increased synthesis of intermediate filaments, including glial fibrillary acid protein GFAP and vimentin, as well as production of many bioactive molecules (Eddleston and Mucke, 1993; Silver and Muller, 2004; Seifert et al., 2006). The possibility that density of receptors expressed at the astrocytic plasma membrane level, might be an additional component governing the NVU.

Several important studies have shown that, like many receptors, the GABA_A receptor (GABA_{AR}) is sensitive to brain pathologies. These receptors are believed to be pentameric heterooligomers mainly constructed from a range of homologous subunit types α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ and ϵ (Seighart, 2006; Nutt and Sthal, 2009; D'Hulst et al., 2009). Expression of α and β receptor subunits produces functional GABA_A-gated channels, and their co-expression with the γ_2 and γ_3 subunit is essential for benzodiazepine sensitivity (D'Hulst et al., 2009). There is increasing evidence that GABA_{AR} may be involved in differentiation and proliferation during development and in lesioned adult brain. In particular, GABA_{AR} activation inhibits the proliferative effects of basic-fibroblast growth factors on cortical progenitors, leading to an increased number of differentiated neurons (Antonopoulos et al., 1997). In pathological conditions, significant decrease of benzodiazepine sites associated to the GABA_{AR} have been demonstrated in patients with ischemic cerebrovascular (Dong et al., 1997, Moriwaki et al., 1998 ; Muller et al., 2002), Parkinson's (Kawabata et al., 1996), and Alzheimer's (Mizukami

et al., 1998a; Mizukami et al., 1998b; Ohyama et al., 1999; Rissman et al., 2003) diseases. In *in vivo* models, GABAergic binding sites have been shown to decrease within various brain regions other several days following different ischemia models (Mileson et al., 1992; Schiene et al., 1996). It was also observed a reduced chloride conductance (Verheul et al., 1993), a decrease in receptor mediated inhibitory post-synaptic potentials (Luhman et al., 1995) and a marked down-regulation of the GABA_AR expression at the cell surface along with a fast time course (Li et al., 1993; Schwartz-Bloom and Sah, 2001; Tateishi et al., 2006). These findings suggest that a deficit in GABA neurotransmission cannot be due to loss of neuron-expressing GABA_AR, and contributes to the development of neuronal degeneration following cerebral lesion (Li et al., 1993 and Schwartz-Bloom and Sah, 2001).

The GABA_AR is expressed at high levels not only in neurons but also in astrocytes of the mature rodent brain (Bureau et al., 1995). Although previous studies have demonstrated negligible expressions of GABA_AR in cultured astrocytes (Hansen et al., 1991; Hösli et al., 1990; Hösli and Hösli, 1990), electrophysiological, immunohistochemical, and biochemical investigations have led to evidence for astrocyte expression of GABA_AR in culture (von Blankenfeld et al., 1991), brain slices (MacVicar et al., 1989), acutely isolated hippocampal slices (Fraser et al., 1995), and membrane fractions of the mature rodent brain (Bureau et al., 1995) and also *in vivo* (Tateishi et al., 2006). Thus, these discrepancies suggested that expression and/or responses mediated by the GABA_AR can be influenced by the maturation, differentiation, or activation of astrocytes (Hösli et al., 1997). In reactive and malignant astrocytes, mRNA levels of GABA_AR have been shown to remain constant before diminution of functional GABA_AR (Tyndal et al., 1994; Tateishi et al., 2006). Thus, the disappearance of GABA_AR expression is correlated with higher glial proliferation rate after stroke or during malignancy of astrocytoma (Labrakakis et al., 1998; Tateishi et al., 2006), leading to the non resolved hypothesis that GABA_AR expression/activation works as a repressor of cell proliferation.

Investigations on alterations in GABA_AR-mediated functions, receptor densities or modulation in astrocytes, remain unchallenged. It has been demonstrated that simultaneous activation of different postsynaptic receptors by the co-application of specific neurotransmitters induces cross-modulation of their activation properties and receptor insertion/deletion from the post-synaptic membrane. Negative cross-talk has been demonstrated between P2X and nicotinic acetylcholine receptors (Li et al., 2003), dopamine and adenosine receptors, GABA_AR and dopamine D5 (Liu et al., 2000) or P2X receptors as well as between dopamine D1 and NMDA receptors (Lee et al., 2002). Moreover, cultured

astrocytes expressed functional receptors for a high proportion of the mediators acting as neurotransmitters and vasoactive peptides (Hansson and Rönnbäck, 2004, Kis et al., 2003). As many of them are released by endothelium and astrocytes, there is a potential for complex signalling between cells in the NVU, involving receptor cross-talks.

Urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide URP, are highly efficient vasoactive peptides of eleven and eighteen residues respectively, that share a fully conserved C-terminal cyclic CFWKYC core corresponding to the pharmacophore of the peptides (Labarrère et al., 2003, Sugo et al., 2003; Leprince et al., 2008). The biological action of UII and URP are mediated through activation of a common class A G protein-coupled receptor (GPCR) receptor originally called GPR14 and now renamed UT. It is now clearly established that activation of native UII receptors or UT-transfected cell lines is associated with an increase in polyphosphoinositide (PIP) turn-over causing an increase in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) (Liu et al., 1999; Elshourbagy et al., 2002; Ziltener et al., 2002). A number of evidence revealed that UII plays a crucial role in the physiology and pathophysiology of the cardiovascular system (Douglas et al., 2004). In the brain, UII mRNA is particularly abundant in motoneurons of the medulla oblongata and spinal cord (Coulouarn et al., 1998, 1999) while UT mRNA is widely expressed in various regions of the central nervous system (CNS) including the olfactory system, hippocampus, amygdala, hypothalamus, or cerebellum (Sugo et al., 2003). However, immunohistochemical studies revealed that UT is expressed in astroglial processes *in vivo* (Lin et al., 2003) and in cultured rat cortical astrocytes (Castel et al., 2006). In astrocytes, we have previously demonstrated that UII activates a PLC/PIPs/ Ca^{2+} transduction pathway, *via* both G_q and $G_{i/o}$ proteins (Castel et al., 2006; Jarry et al., in press), and stimulates cell proliferation. Moreover, a functional interaction between GABA_AR and UT suggested a cross-talk between these two receptors, involved in astrocyte activity (Desrues et al., 2008).

Here, we demonstrate that activation of the vasoactive UT receptor induces a long-term inhibition of the GABA_AR-mediated chloride currents, a process potentially relevant in astrocyte proliferation. We show the co-expression of UT and the γ_1 and γ_2 subunit in glial processes and also Purkinje neurons in rat cerebellum. Electrophysiological recordings further demonstrated that UII induced a very high efficient long-lasting inhibition of the GABA_AR activity in astrocytes, not in neurons, in a co-culture model. When co-expression of the two receptors is reconstituted in CHO cells, we show that UII-induced regulation of the GABA_AR function requires at least $\beta\gamma$ subunit complexes, and provokes accentuated desensitization of GABA_AR chloride current. The UII effect is characterized by G protein-independent fast

Résultats

short-term and delayed irreversible run-down of the GABA_AR current. Our results show that the run-down is partially blocked in the presence of various kinase and phosphatase inhibitors, and was totally abolished after inhibition of dynamin, a protein known to be involved in the internalization of the GABA_AR. The long-term UII-induced inhibition requires the most distal part of the C-terminus portion of UT, and may involve the second intracellular loop of the GABA_AR subunits. Thus, we confirm that activation of UT lead to a down regulation of the GABAergic activity attributable to GABA_AR internalization, a mechanism likely relevant for astrocyte proliferation.

Results

GABA_{AR} and UII receptor functional coupling in rat cerebellar astrocytes

In order to gain insight into correlation between GABA_{AR} expression and the reactive state of astrocytes, post-natal (P7) purified astrocytes were cultured after one passage in mono-culture and in co-culture with cerebellar granule cells at 1, 3 and 6 day-in-vitro (DIV). Two morphological phenotypes for astrocytes were detected, small cell body and many thin processes or flat and polygonal, this second one being observed at 6 DIV, when astrocytes have proliferated until confluence in the absence of neurons. However, from 3 to 6 DIV, a number of astrocytes co-cultured with neurons retained a stellate phenotype and exhibit a less dense glial network (data not shown). We and others have previously demonstrated that astrocytes express *in vitro* and *in vivo* mRNA and/or protein for the UII receptor named UT (Lin et al., 2003; Castel et al., 2006). In 5-6 DIV co-culture, expression of UT was further investigated in astrocytes co-cultured with cerebellar granule neurons by double immunolabeling with the antibodies directed against rat UT, the astrocyte marker GFAP and/or the specific marker of mature neurons NeuN. As shown in Fig.1Aa and b, UT is extensively expressed in astroglial processes, but also in the sparse mature granule cells present in the co-culture. In addition, we found that although granule cells are known to express GABA_{AR} subunits (Fritschy and Panzanelli, 2006), anti- γ_1 (Fig.1Ac) and in a less extent anti- γ_2 (Fig. 1Ad) subunit staining are relatively faint in co-culture, some cells being co-labeled with the antibody raised against UT. The expression patterns of γ_1 GABA_{AR} subunit and UT are quite similar, and the immunoreactive cell distribution is clearly seen in astrocytes processes. In order to investigate a potential cross-talk between GABA_{AR} and UT in both astrocytes and neurons, patch-clamp recordings were first carried-out on membrane potentials and currents of astrocytes in mono-culture, and astrocytes or neurons in co-culture (Fig. 1B and C). By using gramicidin-perforated patch-clamp configuration to avoid diffusion of cytoplasmic factors out of the recorded cells and disturbance of intracellular Cl⁻ concentration, we established that flat and proliferating astrocytes in mono-culture exhibited a depolarized mean resting potentials of -46.38 ± 4.34 mV ($n = 31$), and failed to show GABAergic activity (12% responding cells) (Fig. 1B). In contrast, astrocytes cultured with cerebellar granule neurons present a stellate astrocytic morphology (Fig. 1B) and did not reach confluence after 6 DIV, correlated with the appearance of an astrocyte population with more negative resting membrane potentials (-56.55 ± 3.37 mV ($n = 78$)) being responsible for a higher proportion of responding cells (48%). In co-cultured astrocytes, local perfusion of rat

*r*UII ($rUII, 10^{-7} M, 40 s) provoked a marked inhibition of the amplitude of the depolarization and chloride current (voltage clamp; -60 mV) evoked by the GABA_{AR} agonist isoguvacine (Iso, 10^{-4} M) by $24.2 \pm 7.5\%$ and $33 \pm 8\%$ ($n = 5$), respectively (Fig. 1C). In contrast, *r*UII did not affect the Iso-evoked depolarization and current in cerebellar granule neurons (Fig. 1C). In astrocytes, *r*UII induced a dose-dependent inhibition of the current for concentrations ranging from 10^{-13} to 10^{-8} M (Fig. 1D). The best fit of the normalized dose-response curve yielded an IC_{50} value $43.6 \pm 23.7\%$ pM, with a significant decrease and maximum inhibition detected from *r*UII concentrations of 10^{-13} M, and 10^{-9} M, respectively (Fig. 1D). These data indicate that in astrocytes, unlike in neurons, *r*UII efficiently and markedly down regulated the GABAergic activity when UT and γ subunits of the GABA_{AR} are co-expressed.$

To further confirm whether UT and the GABA_{AR} might be co-expressed *in situ*, particularly in astroglial cells, we investigated the topographic cellular and subcellular distribution of UT at postnatal day 7 (P7) in cerebellar slices, when the maturation of synapses is just taking place. We show by confocal microscopy that UT protein immunoreactivity was specifically distributed in particular zones of the cerebellar cortex, in the Purkinje cell layer (PCL), and on fibers irradiating from the thin molecular cell layer (ML) toward the external granule cell layer (EGL), and on isolated cells residing in the internal granule cell layer (IGL) (Fig. 2). In particular, UT receptor staining was present on NeuN-positive mature granule cell bodies of IGL (Fig. 2A and A') and also in Purkinje neuronal cell bodies and fibers of the PCL projecting into the ML (Fig. 2A), as revealed by the strong immunofluorescence of UT in calbindin-positive Purkinje cells (Fig 2B), in the soma and ramifications (Fig. 2B'). It is known that during development, Bergmann fibers are associated with migrating granule cells, and that doublecortine (DCX) is a distinctive marker of granule cells only during the period of radial descent into the deep cerebellar layers (Sotelo, 2004). Therefore, we used the DCX immunoreactivity to observe the potential expression of UT into the immature migrating granule neurons. The DCX immunoreactivity appeared as a diffuse labeling in the IGL and densely in the ML enriched in radial migrating granule cells, contiguously associated to UT-positive components but not co-localized (Fig. 2C and C'). Moreover, UT was strongly co-localized with GFAP expressed by astrocytes of the white matter (not shown), and on glial cells corresponding to Bergmann cells (Taft et al., 2005) scattered among granule neurones of the IGL and fibers of the ML and EGL (Fig. 2D). At higher magnification, the double immunofluorescence analysis revealed that Bergman cell bodies and fibers were surrounded by yellow co-localizing signals of UT varicosities and of

GFAP-positive filaments (Fig. 2D'). We next examine the localization of γ subunits of the GABA_{AR} in the rat cerebellum at P7. Immunohistochemical analysis showed strong labeling of the γ_1 subunit in Purkinje cells, and faint staining in fibers of the ML and in granule cell bodies of the IGL, co-localizing with UT (Fig. 2E, E'). The γ_2 subunit immunoreactivity was also mainly detected in Purkinje cells and fibers of the EGL (Fig. 2F, F').

Differential inhibitory effect of *hUII* on $\alpha\beta$ and $\alpha\beta\gamma$ subunit-containing GABA_{AR}

In order to establish a direct functional link between the GABA_{AR} and UT, and to determine whether the modulation of the GABAergic activity by UII requires specific domains or subunits of the GABA_{AR}, whole-cell patch-clamp recordings were performed on stable CHO cell lines expressing human UT, and transiently transfected with various cDNAs encoding recombinant human GABA_{AR} subunits. For each GABA_{AR} subunit composition, *i.e.* $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_1\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_1$, $\alpha_2\beta_1\gamma_1$, $\alpha_2\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\beta_3\gamma_2$ and $\beta_1\gamma_2$, cells were voltage-clamped at -70 mV and typical current exhibited a slow decay during continuous agonist Iso application (Fig 3A). The effect of graded concentrations (10^{-13} – 10^{-7} M) of *hUII* was studied on the current evoked by Iso (10^{-4} , 5 s) on CHO-UT, co-expressing each combination of GABA_{AR} type subunits. Perfusion of *hUII* (1 min) induced inhibition of GABA_{AR} complexes systematically containing γ_1 or γ_2 subunit (Fig. 3A). The normalized data were then fitted using a single isotherm function (see “Material and Method sections), and the fit showed that *hUII* depressed the chloride currents from GABA_{AR} complexes $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_1\gamma_2$, $\beta_3\gamma_2$ and $\beta_1\gamma_2$ with IC₅₀ values of 49.00 ± 0.31 , 20.40 ± 0.45 , 79.4 ± 0.95 and 366.1 ± 0.7 , respectively (Table S1). The concentration-dependent inhibition of the current was also detected for $\alpha_2\beta_3\gamma_1$, $\alpha_2\beta_1\gamma_1$ complexes but yielded rather different IC₅₀ values (Table S1). In contrast, *hUII* was less effective on the $\alpha_2\beta_3\gamma_1$ and $\alpha_2\beta_1\gamma_1$ or totally ineffective on the $\alpha_2\beta_3$ and $\alpha_2\beta_1$ CHO expressing complexes (Table S1). The efficacies and potencies of the effect of *hUII* on the different GABA_{AR} combinations are summarized in the Supplementary Table 1. In addition, as already demonstrated (Davies et al., 1997), expression of β_3 homomers in CHO exhibited spontaneous currents resulting from opening of the chloride channel in the absence of Iso, which were totally insensitive to *hUII* (data not shown).

Specific involvement of UT in the modulation of the GABA_AR

It was important to test whether the effect of *hUII*, but also of other urotensinergic modulators, may alter the GABA_AR function, in the absence of UT. Thus, cDNA encoding human $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits of the GABA_AR were transiently transfected in non UT expressing CHO. It has been already shown that the GABA_AR allosteric modulator β -carboline DMCM, acting at the benzodiazepine receptor site, exerts an inhibition of $\alpha_{1-3}\beta_1\gamma_2$ subunit complexes changed into a potentiation of $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ receptors (Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993), and fails to affect $\alpha\beta$ complexes, lacking γ subunits. Thus, DMCM (10^{-5} M) was systematically tested to verify whether the γ_2 subunit was associated to the GABA_AR channel complex. Our data demonstrate a mean of $22.47 \pm 3.21\%$ inhibition of the current in most tested cells (Fig. 4A). To gain further insight into the mechanism of the UT-dependent modulation the Iso-evoked current, the effect of *hUII* and its paralog URP characterized as being the other endogenous ligand of UT (Sugo et al., 2003; Jarry et al., in press) were tested on the amplitude of the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_AR currents in CHO. We found that they failed to affect the amplitude of the current during agonist ligand perfusion (1 min) and after 2-min washout (Fig. 4A). A specific rat UT antagonist previously characterized in our laboratory (Diallo et al., 2008), the URP analog [Orn^5]-URP, and a high-affinity human and primate UT specific antagonist, palosuran (Clozel et al., 2004; Behm et al., 2008), were also tested. Thus, as shown in Figure 4A, [Orn^5]-URP and palosuran (10^{-6} M, each) did not modulate the Iso-evoked current in the absence of UT expression. Previous studies and our experimental observations have clearly shown that the extent of the incorporation of γ subunits into heterologously expressed GABA_AR, may vary between transfections. Thus, we analyzed the effect of *hUII* concomitantly to that of DMCM on Iso-induced currents in CHO-UT co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_AR subunits. It appears that the chloride currents were not uniformly inhibited by the inverse benzodiazepine agonist DMCM, the mean inhibition in responding cells being $22.5 \pm 3.2\%$ ($n = 25$), a percentage value very similar to the percent inhibition provoked by *hUII* on the same cells ($21.55 \pm 2.57\%$) (Fig. 2B). It can be noticed that both effects of *hUII* and DMCM were hardly reversible, the inhibition persisting after 2-min washout (Fig. 2B). The amplitude of the *hUII* (10^{-8} M)-induced inhibition was plotted as a function of the DMCM (10^{-6} M)-induced inhibition of chloride currents recorded from twenty five CHO-UT cells expressing the $\alpha_2\beta_3$ and γ_2 subunits of the GABA_AR. The percent of inhibition was calculated from cells receiving a 1-min application of DMCM, and after

10-min washout, perfused with *hUII* (1 min). A linear regression analysis confirmed the significance of a correlation as represented on the scatter plot ($r^2 = 0.8$, $P < 0.001$).

In CHO-UT co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_AR subunits, *hUII* and URP (10^{-8} M, each) provoked a marked current inhibition by $29.24 \pm 1.90\%$ ($n = 54$) and $22.9 \pm 3.5\%$ ($n = 12$), respectively, that persisted during washout for *hUII*, but completely recovered for URP (Fig. 4C). In order to examine whether UT antagonist might counteract the UII-induced decrease of the GABAergic activity, [*Orn*⁵]-URP and palosuran were tested. [*Orn*⁵]-URP (10^{-6} M) significantly, but weakly inhibited the Iso-evoked current by $17.84 \pm 4.00\%$, blocked the effect of the acute application of *hUII*, but failed to counteract the prolonged effect of the peptide on the same cell (Fig. 4D). Surprisingly, the very specific primate antagonist palosuran, mimicked the *hUII*-induced inhibition of the Iso-evoked current (*hUII*, $29.24 \pm 1.90\%$, ($n = 54$); palosuran, $31.59 \pm 5.34\%$, ($n = 7$), but abolished the irreversible action of *hUII* during washout (Fig. 4E). This indicating that well characterized urotensinergic antagonists may keep their antagonist profile *versus* UT, but exhibit “agonistic activity” in regard to the GABA_AR activity.

The pharmacological characterization of the UT-induced $[Ca^{2+}]_c$ increase was then investigated. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ evoked by urotensinergic ligands *hUII*, URP, [*Orn*⁵]-URP and palosuran were measured by Ca^{2+} fluorescence imaging in CHO-UT preloaded with the acetomethoxyester form of Fura-2 (Fura-2 AM). Fluorescence signals were measured at 1-s intervals during the recording session. A continuous fluorescence imaging was done on cells stimulated for 1 min with UT agonists for a period of 33 min. When applied to the bath solution at 10^{-8} M, *hUII* and URP evoked a significant and rapid increase of the amplitude of the baseline $[Ca^{2+}]_c$ by 322% and 341%. Surprisingly, the effect of *hUII* was irreversible during 16-min washout period, and only partially recovered after 33-min (Fig. 5A) as compared with URP whose effect totally recovered after 16-min washout (Fig. 5B). It is also observed that [*Orn*⁵]-URP (10^{-6} M) behaved as a partial agonist, increasing the $[Ca^{2+}]_c$ by 265% but prevented the sustained effect of *hUII* on the $[Ca^{2+}]_c$, revealing the ability of this peptide to competitively antagonize *hUII* binding (Fig. 5C). In contrast, palosuran (10^{-6} M) failed to evoke a $[Ca^{2+}]_c$ rise and completely blocked the *hUII*-induced $[Ca^{2+}]_c$ increase on UII-responding cells (Fig. 5D).

GABA_AR pharmacology and gating properties when co-expressed with UT

The ability of classic pharmacological modulators to affect the GABA_AR function on the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunit complexe co-expressed with UT, was also tested. Barbiturates have been described to modulate GABA_A receptor function by increasing the mean open duration time of the chloride channels (Macdonald et al. 1989), the SR95531 is a competitive and reversible antagonist of GABA_A receptor-mediated currents, and picrotoxin has been described as an open channel blocker selective for GABA- and glycine-gated chloride channels (Rabow et al., 1995). Thus, we found that the specific positive allosteric GABA_AR modulator pentobarbital (10^{-5} M) directly activated a chloride current, and reversibly potentiated the Iso-evoked current by $196.28 \pm 12.33\%$ ($n = 8$) (Fig. 1AS). In addition, SR95531 (10^{-5} M) and picrotoxin (10^{-4} M) induced attended current inhibition by $76.92 \pm 10.35\%$ ($n = 5$), $76.92 \pm 10.35\%$ ($n = 5$) and by $56.76 \pm 4.33\%$ ($n = 9$), respectively (Fig. 1AS). This indicates that pharmacological characteristics of the GABA_AR is not altered by the presence of UT. To determine whether activation of UT might modify the conductance and selectivity of the GABA_AR-channel complex, the current-voltage (I-V) relationship was studied on CHO-UT co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_AR subunits. The voltage-dependence of the cell response to Iso (10^{-4} M) was investigated in the absence or presence of *h*UII and the amplitude of the current was measured at different holding potentials (Fig. 1BS). Local perfusion of *h*UII (10^{-8} M) decreased the slope of the I-V curve but did not significantly shift the chloride reversal potentials (EqCl⁻, control, 4.84 mV; *h*UII, 3.36 mV; $n = 5$), closed to the theoretical EqCl⁻ value calculated from the Nernst equation, based on the external and internal chloride concentrations used during recording (see Material and Methods sections). It is observed that *h*UII-induced inhibition of the Iso-evoked current recorded at -60 mV ($26.93 \pm 6.35\%$) and +60 mV ($37.06 \pm 11.25\%$) ($n = 5$) was very similar and did not significantly dependent on the holding potential.

To clearly assess the mechanism of UT-mediating inhibitions of the chloride current, the effect of *h*UII was tested on the fast component of GABA_AR current desensitization. A longer saturating concentration of Iso (10^{-4} M, 25 s) were applied in the vicinity of CHO-UT- $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ co-expressing cells. In Figure 6A, the current evoked by Iso showed a slow decay during continuous agonist ejection as observed as an apparent desensitization of around 59% in control, and 77% under perfusion with *h*UII (10^{-8} M, 1 s). Among all recording sessions, the current decay measured from the peak current to the level reached at the end of the Iso pulse was best fitted by a single exponential. We found that the time constant significantly

decreased from $12.46 \pm 1.85\%$ in control to $7.86 \pm 0.46\%$ ($n = 5$) in the presence of *hUII* (Fig. 6A). The data presented in Fig. 6B showed that activation of UT resulted in the modulation of the recovery from desensitization of the GABA_{AR} current. This receptor-channel parameter was measured by applying a long pulse duration (25 s) with a saturating concentration of Iso (10^{-4} M) in order to approach a steady-state current, followed by increasing time intervals between sequential agonist ejections. The peak current recorded during 25 s in the absence of *hUII* was used as a normalization control. Test pulses were given shortly after the desensitizing pulse and when the interval between desensitizing and test pulses increased, the peak current response to a test pulse increased. Rates of recovery from desensitization were monitored by plotting peak current responses to test pulses normalized to the peak current response to the desensitizing pulse, as a function of the interval between desensitizing and test pulses (Fig. 6B). We followed the time-dependent recovery from desensitization in the absence or presence of *hUII* (10^{-8} M). Recovering of 50% receptors from this long exposure occurred with mean time constants of 16.2 s in control and 82.2 s in the presence of *hUII*, demonstrating that the progressive recovering of the current amplitude is delayed in the presence of the peptide (Fig. 6B). We thus measured the remaining inhibitory effect of *hUII*, when receptors have been mostly desensitized by repetitive trains of brief Iso pulses (10^{-4} M, 1 s, 0.4 Hz) delivered on CHO, or CHO-UT expressing the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} subunits. The Iso-evoked currents were initially large and gradually diminished over the course of the experiment, stabilizing mainly after seven pulses. It is shown that *hUII* did not alter the chloride current on CHO-GABA_{AR} but significantly and rapidly depressed the current after less than 1 s perfusion on CHO-UT-GABA_{AR}. This rapid effect was shown to develop as fast as that of DMCM, the direct allosteric modulator the GABA_{AR} (Fig. 6C).

Mechanisms promoting fast short-term and long-term UII-induced GABA_{AR} current inhibition

In CHO-UT co-expressing the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} subunits, the Iso-activated currents was measured in standard whole-cell with GTP (10^{-4} M) and ATP (10^{-3} M) in the intrapipette solution, during a 30 min recording period from the initial application of the GABA_{AR} agonist. In control conditions, the plot of the mean normalized amplitudes revealed that a progressive decline all along the recording session (Fig. 7A). A 1-min application of *hUII* (10^{-8} M) provoked a fast and significant decrease of the Iso-evoked current ($23.44 \pm 2.47\%$,

$n = 10$) and followed by a progressive current run-down, reaching $84.61 \pm 5.92\%$ ($n = 4$) inhibition after 24 min washout. Thus, UT activation almost completely vanished the functional expression of the GABA_{AR} at the plasma membrane (Fig. 7A). The observed marked run-down is very surprising, since it developed during the washout period. To further explore the mechanisms sustaining the *h*UII-induced long-term depression of the GABA_{AR}, we hypothesized that various UT-coupling to G proteins, relays $[Ca^{2+}]_c$ rise resulting in kinase or phosphatase activation, likely responsible for changes in GABA_{AR} subunits phosphorylation state. Thus, to first verify the possible involvement of UT-associated G proteins in the UII-induced inhibition of the GABA_{AR} function, the intracellular compartment of CHO-UT cells co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits was dialyzed with GTP- β -S (10^{-4} M), the inactive analog of GTP. We found that G protein specific blockage did not prevent the fast and long-term inhibition of the Iso-evoked currents induced by *h*UII (Fig. 7B). Moreover, intracellular dialysis with a cocktail of kinase and phosphatase inhibitors (KIC), composed of phosphatase inhibitors 1X (see Material and Method section), quercetin (10^{-5} M) and staurosporine (10^{-5} M), failed to alter the fast *h*UII inhibitory effect but partially attenuated (KIC, $-36.07 \pm 7.96\%$, $n = 8$) the run-down phenomenon (Fig. 7C). To exclude any contribution of UT-associated Ca^{2+} transduction pathway, the *h*UII-induced $[Ca^{2+}]_c$ increase and chloride current decrease were simultaneously recorded. Using the voltage-clamp configuration, Fura-2 AM loaded CHO-UT-GABA_{AR} were held at -70 mV and iterative ejections of Iso (10^{-4} M) evoked stable peak current amplitudes. In the representative example of the Fig 7D, bath perfusion of *h*UII (10^{-8} M) reduced the peak current amplitude by 24% since only 5-s perfusion, but evoked a peak calcium increase of 117.7% only after a 10-s delay. After the transient calcium increase, the chloride current amplitude progressively diminished during the recording time (Fig. 7D). Consistent with this observation, intracellular BAPTA (10^{-4} M) dialysis only reduced by $39.29 \pm 10.16\%$ ($n = 9$) the long-term current inhibition (Fig 7E). Together, these observations tend to show that neither G protein neutralization, calcium transients, nor phosphorylation mechanisms play a crucial role in the run-down of the GABA_{AR} current provoked by UT receptor activation. A number of studies have demonstrated that the phosphorylation state of the receptor is a key element to determine the surface stability of the receptor at the membrane (Krishek et al., 1994; Moss et al., 1995; Henneberger et al., 2002; Kittler and Moss, 2003; Jovanovic et al., 2004). Although there is conflicting evidence concerning the exact mechanism of the internalization process of the GABA_{AR}, a clathrin- and dynamin-dependent process has been shown to be the most often

encountered (Connolly et al., 1999; Kittler et al., 2000). To test hypothetical role of UII in the dynamin-dependent GABA_{AR} endocytosis, a dynamin inhibitory peptide DIP, which competitively blocks binding of dynamin to amphiphysin (Lissin et al., 1998) has been introduced in the intrapipette solution. As shown in Figure 7F, when cells were dialyzed with DIP (10^{-5} M), *hUII* (10^{-8} M) retained its capacity to induce a fast and highly reversible inhibition ($21.93 \pm 3.95\%$, $n = 9$) of the Iso-evoked current, but failed to reduced the current amplitude with time recording.

We further confirm that UT activation regulates the GABA current *via* increased endocytosis, and symmetrically decreases of GABA_{AR} expression at the plasma membrane. In a first step, we establish the sub-cellular localization of both UT and GABA_{AR} in cultured CHO transiently transfected with cDNAs encoding recombinant HA-tagged UT (UT^{HA}) and the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -c-myc tagged (γ_2^{c-myc}) GABA_{AR} subunits. As already detected in patch-clamp recordings of GABAergic electrical activity, less than 50% of cells were efficiently transfected with GABA_{AR} subunits. In non-treated cells, we observed that UT and the γ_2 subunit were targeted to the plasma membrane, and are co-localized in a majority of cells (Fig. S2). In the presence of *hUII* (10^{-8} M) and/or Iso (10^{-4} M), labeling corresponding to UT^{HA} and also γ_2^{c-myc} , appeared re-distributed in the cytosolic cell compartment (Fig. S2), indicating that activation of UT or GABA_{AR} might be sufficient to trigger internalization of the two receptor complexes. In a second step, internalization of GABA_{AR} was followed by labeling the surface receptors with antibodies directed against the extracellular epitope tag HA on the N-terminus of the β_3 (β_3^{HA}) co-expressed with $\alpha_2\gamma_2$ GABA_{AR} subunits and/or UT. These cells were pre-bound with the HA antibody, and after removal of excess of antibody, were incubated in the absence or presence of *hUII* (10^{-8} M), Iso (10^{-4} M), or a combination of *hUII* and Iso. In the absence of ligand exposure, the immunoreactivity for the GABA_{AR} β_3 subunit exhibited a membrane localization (green) in non permeabilized cells, the proportion of internalized receptors (in red) being absent (Fig. 8Aa). Intensity profiles highlight the distribution of fluorescence at the plasma membrane (green) in control condition. In contrast, treatment with *hUII*, Iso or both receptor agonists, drastically induced GABA_{AR} endocytosis, which could be seen by the increase of red punctuates in the cell soma (Fig. 8Ab-d). The nucleus, visualized as a decrease in fluorescence in the green curve in control condition, was not responsible for the intracellular accumulation of GABA_{AR}. Figure 8B showed the relative percent of membrane fluorescence corresponding to ratio between the fluorescence level measured at the interface between trace line and cell membrane (referred as plasma

membrane) and the fluorescence level detected in the half of the trace line (referred as being intracellular). Experiments were performed on CHO transiently expressing the GABA_{AR} $\alpha_2\beta_3^{\text{HA}}\gamma_2$ in the absence or presence of the co-expressed UT. In non-treated CHO-UT-GABA_{AR}, the green intensity labeling mainly located at the plasma membrane was $87.29 \pm 2.14\%$ ($n = 10$) as compared to cytosol. After 10 min treatment in the presence of *hUII*, Iso or both receptor agonists, the intensity labeling at the plasma membrane drastically diminished by $40.29 \pm 4.14\%$ ($n = 18$), $39.31 \pm 2.84\%$ ($n = 12$) and $34.71 \pm 3.19\%$ ($n = 5$), respectively. When the GABA_{AR} was expressed alone, *hUII* failed to induce GABA_{AR} internalization whereas Iso or Iso combined with *hUII* remained constant in their ability to provoke GABA_{AR} removal from the plasma membrane (Fig. 8B).

UT-induced extension of the GABAergic activity requires its cytosolic C-terminus domain

To assess whether the C-terminus fragment of UT, corresponding to the cytoplasmic C-tail of the receptor contribute to the UII-induced run-down of the GABA_{AR} activity, we constructed four truncated mutants in which the last 19 (UT^{HA}₃₇₀), 38 (UT^{HA}₃₅₁), 57 (UT^{HA}₃₃₂) or 70 (UT^{HA}₃₁₉) residues were removed (Fig. 9A). In the UT^{HA}₃₇₀, two polyproline motifs, one of type I and the other of type II, have been removed. In contrast, in the UT^{HA}₃₅₁ mutant, a cluster of serine residues were missing (Fig. 9A). Very similar mutants evolving from rat UT, have already been validated for their binding capacities and cell membrane expression (Proulx et al., 2005). In order to assess the functional properties of the truncated mutants, microfluorimetric studies of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ were performed using increasing concentrations of *hUII* in transiently transfected CHO with mutant cDNAs. We extracted EC₅₀ values significantly lowered for truncated UT^{HA}₃₇₀, UT^{HA}₃₅₁ and UT^{HA}₃₃₂ mutants compared to the wild-type UT^{HA}, the efficiencies of the *hUII*-induced $[\text{Ca}^{2+}]_c$ stimulation exhibiting similar levels (Fig. S3A and B). However, the UT^{HA}₃₁₉ truncated form of UT failed to evoke a calcium response (Fig. S3A and B). Confocal images of CHO expressing either UT^{HA}, or truncated mutants, showed expression of all constructs, including UT^{HA}₃₁₉, at both plasma membrane and cytosolic compartments (Fig. S3C). Together, these data indicate that all truncated forms of UT might be trafficked to the plasma membrane, and that the majority of them relayed normal coupling to the G_q/Ca²⁺ transduction pathway. We thus investigate their capacity to translate the modulation of the GABA_{AR} current in CHO transfected with cDNAs encoding the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits. In CHO-GABA_{AR} co-expressing the UT^{HA}₃₇₀ mutant, the *hUII* (10^{-8} M)-induced fast short-term inhibition was totally blocked, whereas the long-term

inhibition was delayed, and significantly altered by $10.21 \pm 2.03\%$ ($n = 18$) (Fig. 9B). In the presence of shorter truncated forms, *hUII* totally failed to alter the GABA_AR activity, suggesting that the most distal C-terminus part of UT is involved in the functional cross-talk between GABA_AR (Fig. 9B). These data were confirmed by the additional expression of the C-terminus sequence fragment of UT (U₃₁₉₋₃₈₉), a peptidomimetic sequence motif dedicated to act as a competitive inhibitors of putative UT C-terminus protein recognition domains (Fig. 9A). To test this potential behavior, the cDNA encoding the UT^{c-myc}₃₁₉₋₃₈₉ was co-transfected with cDNAs for $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits in the CHO-UT. The peptidomimetic corresponding to the entire fragment of the human UT, completely inhibited the fast and long-term effects of *hUII* on the GABA-evoked current (Fig. 9C). To reversely investigated whether the C-terminus part of UT interacts directly or indirectly with the GABA_AR subunits, cDNAs coding peptidomimetics corresponding to the cytosolic second intracellular loops (i₂) of α_2 (α_2 -i₂), β_3 (β_3 -i₂) and γ_2 (γ_2 -i₂) GABA_AR subunits were prepared (Fig. 9A). Indeed, i₂ of β and γ subunits of GABA_AR subunits, have been shown to possess a number of consensus sites for phosphorylation by serine/threonine and tyrosine kinases (Moss and Smart, 1996) and to physically associate with various proteins involved in receptor trafficking, clustering or endocytosis (Brandon et al., 2002). As depicting in Figure 9, the use of minigenes encoding for α_2 ^{c-myc}-i₂, β_3 ^{c-myc}-i₂ and γ_2 ^{c-myc}-i₂ subunits in CHO-UT co-transfected with cDNAs for α_2 , β_3 and γ_2 , did not significantly interfere with the fast inhibitory effect of UII but significantly attenuated the long-term *hUII*-induced run-down of the Iso-evoked current, by $58.68 \pm 68\%$ ($n = 5$); $66.22 \pm 5.72\%$ ($n = 4$) and $35.35 \pm 12.32\%$ ($n = 6$), respectively after 24 min recordings (Fig. 9D). Collectively, these results indicate that the C-terminus of UT relays the inhibition of the GABA_AR function, whereas intracellular loops of α_2 , β_3 or γ_2 may partially counteract the *hUII*-induced internalization process.

Discussion

It was suggested that GABA acts as an anti-proliferating neurotransmitter in ventricular and subventricular zones (Haydar et al., 2000) and in cortical progenitor cells (LoTurco et al., 1995) and that downregulation of functional GABA_{AR} is correlated with the proliferation rate of reactive or malignant astrocytes (Labrakakis et al., 1998; Tateishi et al., 2006). Currently, the question of the regulation of the GABA_{AR} plasticity and receptor cross-modulations in extrasynaptic glial cells, and the functional consequences were not explored. In the present study, we found that tight promiscuity between the GABA_{AR} and the G protein-coupled receptor for the vasoactive peptide UII, results from a fast inhibition followed by a marked run-down of the GABAergic activity.

There is evidence that UII is expressed in various peripheral organs including the heart and kidney (Ames et al., 1999; Matsushita et al., 2001), and consistently regulates cardiovascular and renal functions (Totsune et al., 2001; Russel, 2004). Moreover, several studies have demonstrated that central administration of UII is involved in behavioral activities, sleep-wake cycles, pressor and tachycardic responses, and in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Gartlon et al., 2001; Matsumoto et al., 2004; Lancien et al., 2004; do Régo et al., 2005; Huitron-Resendiz et al., 2005; Notacker et al., 2005). Moreover, we and others have shown that UT expression may be specific to glial cells within the brain stem hypothalamus, hippocampus and thalamus (Lin et al., 2003) and in cultured astrocytes from rat cortex (Castel et al., 2006), on which UII stimulates cell proliferation (Jarry et al., in press). In cortical astrocytes, our finding have previously demonstrated that UT positive couplings to G_q/PLC/PIP_s and G_s/adenylyl cyclase/cAMP are negatively regulated by GABA_{AR} activation, suggesting the existence of a negative functional interaction between the GABA_{AR} and UT in cortical astrocytes.

In the present study, to gain insight into the regulation of the GABAergic activity by UT in astrocytes, the cellular and subcellular distribution and features of the G protein-coupled UII receptor UT, has been investigated in the cerebellum *in situ*, and in astrocyte-neuron co-cultures from rat cerebellum at P7, when migration of immature granule neurons still occurred, along immature glial processes (Liesi et al., 2003; Sotelo, 2004). Therefore, cerebellum constitutes an excellent model to study how UT may regulate the GABAergic activity in astrocytes and/or neurons, as the various cerebellar cell types remain immature even at the post-natal period, and express more than fourteen GABA_{AR} subunits relatively abundantly (Wisden et al., 1996). At this stage, we report intense UT labeling in Purkinje cell

bodies and ramifications as well as in glial Bergmann-GFAP positive long processes in the ML, radially and longitudinally oriented to the EGL. In developmental cerebellum, Bergmann fibers are associated with migrating granule cells, and it has been shown that doublecortin (DCX) is a distinctive marker of granule cells only during the period of radial descent into the deep cerebellar layers (Rakic, 1971; Gleeson et al., 1999). Thus, we confirmed that UT-immunoreactive fibers are closely associated and contiguous to components labelled by DCX, probably granule neurons migrating from the EGL to the IGL. In co-culture of astrocytes and granule neurones from cerebella at P7, UT is also mainly expressed in astrocytes processes, as revealed by the very high level of co-localization with GFAP. It can be noticed in both co-cultures and cerebellum slices, sparse UT immunopositive cells non expressing GFAP, but stained by the antibody directed against the specific marker of mature neurons NeuN, suggesting that UT may also be faintly express in differentiated granule neurons. These observations are in agreement with previous studies demonstrated that in rodent brain, UT mRNA are detected in some area such as the olfactory system, hippocampus, amygdala, tegmental nuclei, or cerebellum (Purkinje and granule cell layer) (Gartlon et al., 2001; Jégou et al., 2006; Sugo et al., 2003), and the distribution of UII binding sites are restricted in few areas including the cerebellar cortex (Clark et al., 2001; Jégou et al., 2006). Thus, the presence of UT in post-natal rat cerebellum arises at a stage when Bergmann cells specialized in supporting the migration of granule neurons. Consequently, the UT expression in Purkinje cells and Bergmann glia might sustain a role for signaling events needed for interaction and migration of neurons. In the same cell processes, UT appears to be co-localized with γ_1 and, in a less extent, with γ_2 subunits of the GABA_AR, which corroborates previous studies establishing the main expression of α_5 , γ_1 and γ_3 subunits in the Purkinje cell layer (Pirker et al., 2000), since γ_1 mRNA has also been found in Bergman glia (Laurie et al., 1992). Moreover, Bovolin et al., (1992) confirmed by quantitative PCR, that γ_1 subunit mRNA are the most abundant gamma subunits detected in astrocytes from neonatal rat cerebellum.

Responses of astrocytes to GABA have already been demonstrated (Kettenmann and Schachner, 1985; Kettenmann et al., 1987; MacVicar et al., 1989; Mudrick-Donnon et al., 1993; Fraser et al., 1995), *i.e* GABA evokes depolarization of astrocytes and increase of the the $[Ca^{2+}]_c$ (Nilsson et al., 1993; Fraser et al., 1995), accompanied by morphological alterations (Matsutani and Yamamoto, 1997; Mong et al., 2002). However, it has been shown that early culture period exhibited a GABA_A response which disappeared by *in vitro* aging culture. This mechanism is unclear; either it is explained by the proliferation of GABA_AR-

negative astrocytes or by the decrease in GABA_{AR} protein in cultured astrocytes, or by both (Hösl et al., 1997). Inhibition of astrocytic proliferation in culture where astrocytes were co-cultured with neurons, associated with preservation of GABA response (Gasser and Hatten, 1990), allowed to suggest that proliferation and differentiation of glial cells are modulated by the interaction with neurons. Accordingly, we investigated possible functional interaction between the GABA_{AR} and UT expressed in astrocytes co-cultured with granule neurons. In these conditions, half of astrocytes are responding to the GABA_{AR} agonist isoguvacine, a glial cell population exhibiting a process-bearing morphology, probably attributed to cessation of the cell cycle and differentiation (Hatten et al., 1987; Wang et al., 1994; Weinstein et al., 1990). These astrocytes are also distinguished by a more hyperpolarized resting membrane potential than proliferating cells, non-responding to isoguvacine. Such heterogeneity in the resting potential may arise from the dependence on the degree of intercellular coupling between the recorded astrocyte and the rest of the population (McKhann et al., 1997); as a consequence, more depolarized (measured) resting potentials result from higher level of astrocyte proliferation. The current study was designed by using gramicidin perforated-cell patch-clamp configuration which maintain the physiological intracellular chloride concentration. Ejection of UII in the vicinity of cells elicited decrease of the Iso-evoked depolarization and chloride current amplitudes, in astrocytes but not in granule cells. The UII-induced GABA_{AR} current inhibition is a very high affinity process which slowly recovered in the absence of the peptide (washout period). Since the granule cell layer displays a dense expression network of α_6 , α_1 , β_2 , β_3 and δ subunits (Laurie et al., 1992; Pirker et al., 2000), led to propose that GABA_{AR} essentially composed of α_6 and δ subunits (after P7), would not represent a receptor target for UT. However, our previous study demonstrated that UT-mediating increase in cAMP and PIPs turnover in astrocytes are markedly inhibited by GABA and isoguvacine in cortical astrocytes (Desrues et al., 2008) whereas Ono et al. (2008) have described a negative regulation of the UT-induced neurotransmitter release induced by GABA_{AR} allosteric modulators benzodiazepines. In conjunction with the finding of the present study, it can be suggested the existence of a negative cross-talk coupling between UT and GABA_{AR} specific of astrocytes.

The molecular basis for the observed directional decrease in GABA_{AR} function has been investigated in CHO co-expressing human UT and $\alpha\beta$ and/or γ GABA_{AR} subunits. GABA_{AR} can be made from several different subunit families ($\alpha_1-\alpha_6$, $\beta_1-\beta_3$, $\gamma_1-\gamma_3$, ρ_{1-3} , δ , ϵ , π , and θ), which come together in various combinations to form the pentameric receptor (Frolund et al.,

2002). Most receptors are thought to contain α_1 , β_1 and the third subunit type varying, being often the γ_2 subunit. To assess which receptor complex is particularly affected by UT, we tested graded concentrations of UII on different receptor complexes. Expression of unitary subunits has produced conflicting results, but some subunits expressed alone (Blair et al., 1988; Pritchett et al., 1988) or as binary combinations, for instance $\alpha_1\gamma_2$ or $\beta_2\gamma_2$, appear to be able to produce GABA-gated ion channels (Sigel et al., 1990; Krishek et al., 1994; Angelotti and Macdonald, 1993). We found that UII was very potent and less potent, at decreasing the activity of $\beta_{1/3}\gamma_{1/2L}$ and $\alpha_2\beta_{1/3}\gamma_{1/2L}$ GABA_{AR} subunit complexes, respectively, and failed to modify the GABA_{AR} current when the γ subunit is not associated with binary complexes. It thus demonstrates that UII exhibit a very high affinity toward the inhibition of the GABAergic activity, *via* a mechanism involving the γ subunit. Accordingly, recombinant and native UT receptors have been shown to exhibit very high affinity binding sites (Ames et al. 1999; Liu et al. 1999; Mori et al. 1999; Nothacker et al. 1999; Clozel et al., 2004), including astrocytic receptors (Castel et al., 2006).

The subunit composition determines the GABA sensitivity and the pharmacological properties of the GABA_{AR} (Sieghart et al., 1995; Hevers and Luddens, 1998; Boileau et al., 2002), and the time course of the GABA response refereed as desensitization and deactivation of the chloride currents (Bianchi et al., 2001; Boileau et al., 2003; Feng and Macdonald, 2004). Consistently, the possibility that the $\alpha_2\beta_3\gamma_2L$ receptor subunits co-expressed with UT in CHO, exhibit an altered pharmacological profile has been verified. It was shown that the competitive high affinity antagonist SR95531 depresses, and the barbiturate pentobarbital potentiates, the chloride current, two behavioral responses matching with the previously described mechanisms in recombinant and transfected systems (Hamann et al., 1988; Rupprecht and Holsboer, 1999; Krampfl et al., 2002; Lindquist et al. 2005). In addition, to assess the systematic co-expression of the γ subunit to $\alpha\beta$ binary complexes, we also tested the effect of DMCM on the Iso-evoked current. Therefore, the direction of the modulation exerted by DMCM on GABA currents is negative in cells expressing γ_2 subunit including neurons (Bormann and Clapham, 1985; Puia et al., 1991; Wafford et al., 1993) and positive in γ_1 -expressing cells as cortical astrocytes (Bormann and Kettenman, 1988; Bovolin et al., 1992), and null when γ is not present at all (Bormann and Clapham, 1985; Herb et al., 1992). Our data indicate that DMCM was able to inhibit the GABA_{AR} current in a majority of cells, confirming the co-expression of γ_2 to the recombinant channel complex in CHO-UT. In investigating possible mechanisms that may underlie the effect of UT agonists on reduction of

chloride current, we have found that a short application of UII, significantly affected macroscopic desensitization of $\alpha_2\beta_3\gamma_2L$ receptor currents by accelerating the current desensitization, and markedly slowed the recovering process. These UII-induced desensitization characteristics can be paralleled to desensitization observed for GABA_{AR} exposed to highest GABA concentrations, a mechanism known to develop from the closed but fully bound conducting state of the receptor (Dominguez-Perrot et al., 1996). Moreover, since recovery from desensitization does not involve membrane voltage (Yoon, 1994), it is suggested that UII-induced desensitization is mainly due to conformational changes of the ligand-bound GABA_{AR}. Fast-repetitive applications of the agonist have also been tested to induce a current decay resulting from a displacement of the EqCl⁻ (Le Foll et al., 1998). In these conditions, we have determined that *i*) UII negatively regulates the Iso-evoked current only when UT was co-expressed and *ii*) UII and DMCM provokes similar fast (within less than 2 s) inhibition of the GABAergic activity.

Reciprocally, the pharmacological pattern of UT controlling the GABA_{AR} activity by using UT agonists and antagonists, has been investigated on CHO only expressing the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ receptor subunits, and then on CHO-UT. Thus, UII and its paralog URP, exhibiting the same conserved biologically active cyclic sequence of UII (Leprince et al., 2008), or the UT antagonists [Orn⁵]-URP (peptide) and palosuran (derived from urea), failed to alter the GABAergic activity in the absence of UT. However, on CHO-UT-GABA_{AR}, UII and URP provoked similar current inhibitions, except that URP triggers a reversible effect. This is in accordance with the UII-induced long-lasting in the one hand, and the URP-evoked transient, on the other hand, increase in [Ca²⁺]_c in CHO-UT. The specific long-lasting phenomenon might be attributable to the slow dissociation rate of UII, as already described for rat and human UII on UT transfected cells, skeletal muscle myoblasts and astrocytes (Clozel et al., 2004; Douglas et al., 2004; Qi et al., 2004; Castel et al., 2006). Thus, the slow dissociation might be specific of UII and would likely account for the sustained and washout-resistant contractile responses induced by UII on primate arteries and [Ca²⁺]_c increase in rat cortical astrocytes (Jarry et al., in press), and GABA_{AR} current in our recombinant system. The rapid development in recent years of several distinct UT antagonists (Dhanak et al., 2003; Douglas et al., 2004; Behem et al., 2008) has led to the synthesis of [Orn⁵]-URP which can suppress UII-mediating contraction of rat aortic ring and [Ca²⁺] mobilization assay (Chatenet et al., 2004; Diallo et al., 2008) and of palosuran, one such high affinity human UT (Behm et al., 2008). Both of them induced GABA_{AR} current inhibition, mimicking by this way the action of UII, but counteracted the long-lasting effect of UII, suggesting that [Orn⁵]-URP and

palosuran, can be considered as UT “agonists” toward the GABA_{AR} effector pathway. Surprisingly, we demonstrated that [Orn⁵]-URP acts as a partial agonist and competitive antagonist on [Ca²⁺]c, whereas palosuran is devoid of any effect but counteracts the UII-evoked [Ca²⁺] increase, last findings supported by previous studies demonstrating that palosuran is a specific primate UT antagonist (Behm et al., 2008).

Recordings from cerebellar astrocytes, and in CHO co-expressing UT and α, β and γ subunits of the GABA_{AR}, showed marked inhibition of the chloride current upon activation of UT by UII. The time course of this inhibition can be distinguished by two phases, *i.e.* a short-term decrease detected immediately after and during the UII administration, followed by a progressive run-down of the current, leading to around 80% GABA_{AR} current disappearance. UT has been shown to be coupled to G_{q/11}, G_s and G_i proteins in native and recombinant systems (Proulx et al., 2008), supporting the hypothesis that UII-mediating current inhibition results from kinase and/or phosphatase activation and GABA_{AR} phosphorylation. Therefore, the second large intracellular loop of several GABA_{AR} subunits possesses numerous consensus phosphorylation sites (Moss and Smart, 1996) and effective phosphorylation mechanisms are involved in either short- or long-term regulation of inhibitory synaptic transmission (Moss and Smart, 1996; Brandon et al., 2002; Lüsher and Keller, 2004). Consequently, GTP-β-S was first used to dialyse CHO-UT-GABA_{AR} in order to block the UT couplings to its cognate G proteins, and we found that the UII-induced inhibition is not altered, demonstrating the occurrence of UT-G protein-independent signalling pathways. To discard the implication of calcium and different kinases and phosphatases, we simultaneously measured the UII-induced [Ca²⁺]c and the amplitude of the Iso-evoked current. The time lag between UII-induced reduction of the GABA current and the [Ca²⁺]c rise suggests that the short-term effect does not require calcium, whereas we observed that the long-term run-down is partially reversed in the presence of intracellular BAPTA. Considering that protein kinases can modulate both GABA_{AR} function and trafficking (Brandon et al., 2002; Lücher and Keller, 2004), application of a large-scale inhibitors of PKA, PKC, PTK or Cam KII, and of various phosphatases has been tested during the recording session. Again, the short-term effect was not modified, but the long-term inhibition is only attenuated. Together, it is thus proposed that initiation of UT and GABA_{AR} functional interaction is independent on calcium and classic phosphorylation mechanisms, signalling processes probably required, as a consequence, during run-down of the chloride current. In this context, the Ca²⁺/calmodulin requirement for membrane fusion in endocytic pathways (Priyor et al., 2000), as well as the

clathrin-mediated internalization depending on kinase and phosphatase activities (Lin et al., 1997; Naga Prasad et al., 2005), support here a role of UT in GABA_{AR} endocytosis.

The possibility that the density of the GABA_{AR} at the plasma membrane might be the UII-governing effect, has been raised by recent work revealing that many ionotropic receptors are quite dynamically trafficked and undergo both constitutive and regulated movements between synaptic sites and intracellular compartments. Importantly, recent efforts by a number of groups have indicated that changes in the surface expression of the GABA_{AR}, by the process of insertion or internalization, can play an important role in receptor function. (Wan et al., 1997; Nusser et al., 1998; Kneussel, 2002; Wang et al., 2003). GABA_{AR} internalization is primarily thought to occur *via* a clathrin- and dynamin-dependent mechanism (Kittler et al., 2000; Barnes, 2001). To further investigate the role of endocytosis and recycling in regulating the number of GABA_{AR} at the plasma membrane, we analysed the effect of a particular peptide (DIP) that blocks endocytosis by disrupting the interaction between dynamin and amphiphysin, an interaction that is essential for clathrin-coated pit-mediated endocytosis (Grabs et al., 1997; Connolly et al., 1999; Kittler et al., 2000). It is observed that DIP does not interfere with the fast short-term inhibition but totally abolishes the UII-induced decrease of the GABA_{AR} current, supporting the notion that UT regulates GABAergic activity, at least through internalization. The involvement of the dynamin endocytic pathway in the regulation of the GABA_{AR} activity has been previously described on recombinant and native preparations (Kittler et al., 2000; Kittler et al., 2005), an involved mechanism consecutive to the activation of the dopamine D₃ receptor in neurons (Chen et al., 2006). Since *i*) it was suggested that clathrin-dependent endocytosis of GABA_{AR} concerns the β or γ_2 subunit (Kittler et al., 2000; Herring et al., 2003; Kittler et al., 2008), and *ii*) UT affects GABA_{AR} complexes comprising a γ subunit, we tested the relative contribution of a ligand-dependent mechanism on the regulation of the surface expression of the $\alpha_2\beta_3^{\text{HA}}\gamma_2$ GABA_{AR} subunit. The surface expression of the β_3^{HA} subunit was compared either in standard control medium, in medium supplemented with the GABA_{AR} agonist isoguvacine, UII or both ligands for 30 min, before analysing. We found that exposition to UII is sufficient to reduce the number of GABA_{AR} at the cell surface only when co-expressed with UT. As attended, the GABA_{AR} agonist triggered removal of around 60% of GABA_{AR}; such endocytosis phenomenon is not exacerbated by co-administration of UII. These data show that UII/UT system provokes a marked GABA_{AR} internalization, even in the absence of agonist gating the chloride channel, indicating that UT and GABA_{AR} co-activations are not necessary for UII-

induced GABAergic down regulation.

The exact mechanism by which UT provokes the fast short-term inhibition of the current and long-term endocytosis of GABA_ARs remains unclear. Here we produced and expressed truncated UT receptors in order to identify which portion and/or specific determinants are involved in the GABA_AR modulation. The deletion of up to 57 residues of the UT C-terminus, did not affect the expression and ability of truncated mutants to stimulate the $[Ca^{2+}]_c$. A very similar observation has been made for rat UT truncated mutants that conserve their binding capacity, translocation at the plasma membrane, and activation of PLC or the extracellular signal-regulated kinase ERK signalling cascades (Proux et al., 2005). Here we observed that when UT₃₇₀ is co-expressed with GABA_AR, the fast short-term UII-induced inhibition is totally blocked, and the run-down is delayed, whereas UT₃₅₁, UT₃₃₂ and UT₃₁₉ mutants fail to functionally interact with GABA_AR. In addition, the peptidomimetic corresponding to the entire UT C-terminus, in a same way, totally abolished the UII-mediating effect. Together, these data support the contention that the most distal part of the UT C-terminus relays the fast and long-term inhibitions of the GABA_AR function. This distal C-terminus (351-389) presents two polyproline motifs (Fig. 9) known to possibly interact with SH3 domain proteins (Cao et al., 2000; Agrawal and Kishan, 2002), but not conserved among species. The last 19 residues of the rat UT C-terminus contains motifs that are not crucial for UT internalization (Proulx et al., 2005), the serine cluster localized at position 364-367, displaying consensus motifs for PKC and casein kinase I important for UT endocytosis (Proulx et al., 2005). Therefore, the question whether the sequence 370-389 of the human UT sustains GABA_AR modulation has to be elucidated. Because the modulation of GABA_AR current is completely abolished when binary $\alpha\beta$ combinations were co-expressed with UT, we hypothesized that the intracellular loop of the γ_2 subunit may represent a direct or indirect target sequence for UT. Thus, the used of peptidomimetics corresponding to the second loops of α_2 , β_3 and γ_2 GABA_AR subunits, were co-expressed in CHO-UT-GABA_AR. In this set of experiment, none of these peptide fragments antagonized the fast UII-mediating effect, but each of them, attenuated the run-down phenomenon, indicating an absence of specificity for the ability of intracellular loops to partially counteract the UII-induced GABA_AR run-down. The mini-peptide strategy has previously been successfully used to demonstrate the direct interaction between the GABA_AR and the D5 receptor (Liu et al., 2000), however, our surprising data may be explained either by the inability of peptidomimetics to be sufficiently expressed, and/or to reach target sites during the trafficking process in our CHO model. An

alternative would be to synthesize a cyclic version of each loop, as already proposed for the third cytosolic loop of the vasopressinergic V2 receptor (Granier et al., 2004). However, it might be also supposed that UT interacts with other sequences belonging to γ subunits. In particular, the calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) protein, identified as an integral membrane protein that regulates surface expression of GABA_ARs, has been shown to interact with the M4 domain of the receptor chloride channel (Alldred et al., 2005). Together, the functional cross-modulation between UT and GABA_AR is mediated through the most distal part of the UT C-terminus, which would directly interact with γ subunits, or recruits intermediate proteins implicated in GABA_AR inhibitory transactivation.

Therefore, our observations suggest a model in which UT and GABA_AR are closely associated to depress the GABAergic activity (Fig. 10). In this model, when UT and $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_AR subunits are co-expressed, UII efficiently activates the G protein-coupled receptor UT, leading to a fast short-term decrease of the chloride current, independently of G proteins, calcium, phosphorylation and endocytosis processes, and involving the last 19 amino acids of the UT C-terminus (Fig. 10). During washout, a long-term inhibition refereed as a run-down, develops *via* a dynamin-dependent internalization requiring at least in part the 351-370 sequence of UT, and a calcium- and phosphorylation-dependent endocytic mechanism. This directional cross-talk between UT and the GABA_AR leads to the extinction of the GABA_AR expression at the plasma membrane that would play a key role in the induction of astrogliosis and cell proliferation.

Acknowledgments

This work was supported by Inserm (U982), University of Rouen and the Conseil régional de Haute-Normandie. T.L. is a recipient of a fellowship from INSERM and the Conseil Régional de Haute-Normandie. M.J. and C.L. are recipients of a fellowship from the Ministère de l'Education et de la Recherche.

References

- Abbott NJ, Ronnback L and Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53.
- Agrawal V and Kishan KV (2002) Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein Pept Lett* **9**, 185-193.
- Alldred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G and Luscher B (2005) Distinct gamma₂ subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABA_A receptors and gephyrin. *J Neurosci* **25**, 594-603.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ and Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**, 282-286.
- Angelotti TP and Macdonald RL (1993) Assembly of GABA_A receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci* **13**, 1429-1440.
- Antonopoulos J, Pappas IS and Parnavelas JG (1997) Activation of the GABA_A receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci* **9**, 291-298.
- Barnes EM, Jr. (2001) Assembly and intracellular trafficking of GABA_A receptors. *Int Rev Neurobiol* **48**, 1-29.
- Behm DJ, McAtee JJ, Dodson JW, Neeb MJ, Fries HE, Evans CA, Hernandez RR, Hoffman KD, Harrison SM, Lai JM, Wu C, Aiyar NV, Ohlstein EH and Douglas SA (2008) Palosuran inhibits binding to primate UT receptors in cell membranes but demonstrates differential activity in intact cells and vascular tissues. *Br J Pharmacol* **155**, 374-386.
- Bianchi MT, Haas KF and Macdonald RL (2001) Structural determinants of fast desensitization and desensitization-deactivation coupling in GABA_A receptors. *J Neurosci* **21**, 1127-1136.
- Blair LA, Levitan ES, Marshall J, Dionne VE and Barnard EA (1988) Single subunits of the GABA_A receptor form ion channels with properties of the native receptor. *Science* **242**, 577-579.
- Boileau AJ, Baur R, Sharkey LM, Sigel E and Czajkowski C (2002) The relative amount of cRNA coding for gamma₂ subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABA(A) receptors expressed in Xenopus oocytes. *Neuropharmacology* **43**, 695-700.
- Boileau AJ, Li T, Benkowitz C, Czajkowski C and Pearce RA (2003) Effects of gamma₂S

- subunit incorporation on GABA_A receptor macroscopic kinetics. *Neuropharmacology* **44**, 1003-1012.
- Bormann J and Clapham DE (1985) gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 2168-2172.
- Bormann J and Kettenmann H (1988) Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9336-9340.
- Bovolin P, Santi MR, Puia G, Costa E and Grayson D (1992) Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9344-9348.
- Brandon N, Jovanovic J and Moss S (2002) Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* **94**, 113-122.
- Bureau M, Laschet J, Bureau-Heeren M, Hennuy B, Minet A, Wins P and Grisar T (1995) Astroglial cells express large amounts of GABA_A receptor proteins in mature brain. *J Neurochem* **65**, 2006-2015.
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ and Collins S (2000) Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J Biol Chem* **275**, 38131-38134.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon MC and Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* **99**, 582-595.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihrmann I, Pacaud P and Vaudry H (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* **25**, 1819-1830.
- Chen G, Kittler JT, Moss SJ and Yan Z (2006) Dopamine D3 receptors regulate GABA_A receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* **26**, 2513-2521.
- Clark SD, Nothacker HP, Wang Z, Saito Y, Leslie FM and Civelli O (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain Res* **923**, 120-127.
- Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF and Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-

- ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 204-212.
- Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA and Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15803-15808.
- Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H and Lihrmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* **457**, 28-32.
- Davies PA, Hanna MC, Hales TG and Kirkness EF (1997) Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature* **385**, 820-823.
- Desrues L, Lefebvre T, Diallo M, Gandolfo P, Leprince J, Chatenet D, Vaudry H, Tonon MC and Castel H (2008) Effect of GABA_A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**, 727-734.
- Dhanak D, Neeb MJ and Douglas SA (2003) Urotensin-II receptor modulators. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **38**, 99-110.
- D'Hulst C, Atack JR and Kooy RF (2009) The complexity of the GABA_A receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today* **14**, 866-875.
- Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC and Gandolfo P (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**, 813-819.
- Dominguez-Perrot C, Feltz P and Poulter MO (1996) Recombinant GABA_A receptor desensitization: the role of the gamma 2 subunit and its physiological significance. *J Physiol* **497** (Pt 1), 145-159.
- Dong Y, Fukuyama H, Nabatame H, Yamauchi H, Shibasaki H and Yonekura Y (1997) Assessment of benzodiazepine receptors using iodine-123-labeled iomazenil single-photon emission computed tomography in patients with ischemic cerebrovascular disease. A comparison with PET study. *Stroke* **28**, 1776-1782.
- Do-Rego JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H and Costentin J (2005) Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **183**, 103-117.
- Douglas SA, Dhanak D and Johns DG (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 76-85.
- Eddleston M and Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**, 15-36.
- Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff

- BE, Naselsky D, Disa J and Aiyar NV (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol* **136**, 9-22.
- Feng HJ and Macdonald RL (2004) Proton modulation of alpha 1 beta 3 delta GABA_A receptor channel gating and desensitization. *J Neurophysiol* **92**, 1577-1585.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H and MacVicar BA (1995) GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* **15**, 2720-2732.
- Fritschy JM and Panzanelli P (2006) Molecular and synaptic organization of GABA_A receptors in the cerebellum: Effects of targeted subunit gene deletions. *Cerebellum* **5**, 275-285.
- Frolund B, Ebert B, Kristiansen U, Liljefors T and Krosgaard-Larsen P (2002) GABA(A) receptor ligands and their therapeutic potentials. *Curr Top Med Chem* **2**, 817-832.
- Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H and Tonon MC (1997) The stimulatory effect of the octadecapeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* **322**, 275-281.
- Gartlon J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, Hughes ZA, Taylor SG, Munton RP, Hagan JJ, Hunter JA and Jones DN (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 426-433.
- Gasser UE and Hatten ME (1990) Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4543-4547.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA and Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**, 257-271.
- Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC and De Camilli P (1997) The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* **272**, 13419-13425.
- Granier S, Terrillon S, Pascal R, Demene H, Bouvier M, Guillon G and Mendre C (2004) A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *J Biol Chem* **279**, 50904-50914.
- Hamann M, Desarmenien M, Desaulles E, Bader MF and Feltz P (1988) Quantitative evaluation of the properties of a pyridazinyl GABA derivative (SR 95531) as a GABA_A competitive antagonist. An electrophysiological approach. *Brain Res* **442**, 287-296.
- Hansen GH, Hosli E, Belhage B, Schousboe A and Hosli L (1991) Light and electron microscopic localization of GABA_A-receptors on cultured cerebellar granule cells and

- astrocytes using immunohistochemical techniques. *Neurochem Res* **16**, 341-346.
- Hansson E and Ronnback L (2004) Glial-neuronal signaling and astroglial swelling in physiology and pathology. *Adv Exp Med Biol* **559**, 313-323.
- Hatten ME (1987) Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *J Cell Biol* **104**, 1353-1360.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML and Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* **20**, 5764-5774.
- Henneberger C, Juttner R, Rothe T and Grantyn R (2002) Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. *J Neurophysiol* **88**, 595-603.
- Herb A, Wisden W, Luddens H, Puia G, Vicini S and Seburg PH (1992) The third gamma subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1433-1437.
- Herring D, Huang R, Singh M, Robinson LC, Dillon GH and Leidenheimer NJ (2003) Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* **278**, 24046-24052.
- Hevers W and Luddens H (1998) The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**, 35-86.
- Hosli L, Hosli E, Redle S, Rojas J and Schramek H (1990) Action of baclofen, GABA and antagonists on the membrane potential of cultured astrocytes of rat spinal cord. *Neurosci Lett* **117**, 307-312.
- Hosli E and Hosli L (1990) Immunohistochemical studies on the cellular localization of GABA_A-receptors in explant cultures of rat central nervous system using a monoclonal antibody. *Exp Brain Res* **82**, 667-671.
- Hosli E, Otten U and Hosli L (1997) Expression of GABA(A) receptors by reactive astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS. *Int J Dev Neurosci* **15**, 949-960.
- Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS and de Lecea L (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* **25**, 5465-5474.
- Iadecola C (1998) Neurogenic control of the cerebral microcirculation: is dopamine minding the store? *Nat Neurosci* **1**, 263-265.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **5**, 347-360.

- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Prézeau L, Castel H and Gandolfo P. The vasoactive peptides Urotensin II and Urotensin II-related peptide regulate astrocytes activity through common and distinct mechanisms. Involvement in cell proliferation. *Biochem J*, (in press).
- Jegou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, LePrince J, Vaudry H and Lihrmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **495**, 21-36.
- Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG and Moss SJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci* **24**, 522-530.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA and Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* **1**, 683-692.
- Kawabata K, Tachibana H, Sugita M and Fukuchi M (1996) [Impairment of benzodiazepine receptor in Parkinson's disease evaluated by 123I-iomazenil SPECT]. *Kaku Igaku* **33**, 391-397.
- Kettenmann H and Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* **5**, 3295-3301.
- Kettenmann H, Backus KH and Schachner M (1987) gamma-Aminobutyric acid opens Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Brain Res* **404**, 1-9.
- Kis B, Abrahám CS, Deli MA, Kobayashi H, Niwa M, Yamashita H, Busija DW, Ueta Y (2003) Adrenomedullin, an autocrine mediator of blood-brain barrier function. *Hypertens Res* **26**, S61-70
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG and Moss SJ (2000) Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 7972-7977.
- Kittler JT and Moss SJ (2003) Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 341-347.
- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z and Moss SJ (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABA_A receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 14871-14876.
- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Treter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z and Moss SJ (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif

- in the GABA_A receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3616-3621.
- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Treter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z and Moss SJ (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABA_A receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3616-3621.
- Kneussel M (2002) Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev* **39**, 74-83.
- Krampfl K, Wolfes H, Dengler R and Bufler J (2002) Kinetic analysis of the agonistic and blocking properties of pentobarbital on recombinant rat alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor channels. *Eur J Pharmacol* **435**, 1-8.
- Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Huganir RL, Moss SJ and Smart TG (1994) Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* **12**, 1081-1095.
- Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P and Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* **18**, 77-88.
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J and Kettenmann H (1998) Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci* **10**, 231-238.
- Lancien F, Leprince J, Mimassi N, Mabin D, Vaudry H and Le Mevel JC (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* **1023**, 167-174.
- Laurie DJ, Seeburg PH and Wisden W (1992) The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* **12**, 1063-1076.
- Le Foll F, Castel H, Soriano O, Vaudry H and Cazin L (1998) Gramicidin-perforated patch revealed depolarizing effect of GABA in cultured frog melanotrophs. *J Physiol* **507 (Pt 1)**, 55-69.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM and Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* **111**, 219-230.
- Lefebvre T, Gonzalez BJ, Vaudry D, Desrues L, Falluel-Morel A, Aubert N, Fournier A, Tonon MC, Vaudry H and Castel H (2009) Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons. *J Neurochem* **110**, 976-989.
- Leprince J, Chatenet D, Dubessy C, Fournier A, Pfeiffer B, Scalbert E, Renard P, Pacaud P, Oulyadi H, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Davoust D, Tonon MC and Vaudry H (2008) Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides* **29**, 658-673.

- Li H, Siegel RE and Schwartz RD (1993) Rapid decline of GABA_A receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus* **3**, 527-537.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW and Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* **89**, 1092-1100.
- Liesi P, Akinshola E, Matsuba K, Lange K and Morest K (2003) Cellular migration in the postnatal rat cerebellar cortex: confocal-infrared microscopy and the rapid Golgi method. *J Neurosci Res* **72**, 290-302.
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem* **272**, 31051-31057.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K and Iida M (2003) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* **26**, 839-845.
- Lindquist CE, Laver DR and Birnir B (2005) The mechanism of SR95531 inhibition at GABA receptors examined in human alpha1beta1 and alpha1beta1gamma2S receptors. *J Neurochem* **94**, 491-501.
- Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC and von Zastrow M (1998) Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7097-7102.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Jr., Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF and Caskey CT (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 174-178.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT and Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**, 274-280.
- Lo EH and Rosenberg GA (2009) The neurovascular unit in health and disease: introduction. *Stroke* **40**, S2-3.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB and Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298.
- Luhmann HJ, Mittmann T, van Luijtelaar G and Heinemann U (1995) Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res* **22**, 43-51.

- Luscher B and Keller CA (2004) Regulation of GABA_A receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* **102**, 195-221.
- MacVicar BA, Tse FW, Crichton SA and Kettenmann H (1989) GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci* **9**, 3577-3583.
- Magistretti PJ, Sorg O, Yu N, Martin JL and Pellerin L (1993) Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci* **15**, 306-312.
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T and Fujino M (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* **358**, 99-102.
- Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N and Hirata Y (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* **19**, 2185-2190.
- Matsutani S and Yamamoto N (1997) Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia* **20**, 1-9.
- McKhann GM, 2nd, D'Ambrosio R and Janigro D (1997) Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci* **17**, 6850-6863.
- Metea MR and Newman EA (2006) Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia* **54**, 650-655.
- Metea MR and Newman EA (2007) Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp Physiol* **92**, 635-640.
- Mi H, Haeberle H and Barres BA (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci* **21**, 1538-1547.
- Mileson BE, Ehrmann ML and Schwartz RD (1992) Alterations in the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel following transient forebrain ischemia in the gerbil. *J Neurochem* **58**, 600-607.
- Mizukami K, Ikonomovic MD, Grayson DR, Sheffield R and Armstrong DM (1998) Immunohistochemical study of GABA_A receptor alpha1 subunit in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Brain Res* **799**, 148-155.
- Mizukami K, Grayson DR, Ikonomovic MD, Sheffield R and Armstrong DM (1998) GABA_A receptor beta 2 and beta 3 subunits mRNA in the hippocampal formation of aged human brain with Alzheimer-related neuropathology. *Brain Res Mol Brain Res* **56**, 268-272.
- Mong JA, Nunez JL and McCarthy MM (2002) GABA mediates steroid-induced astrocyte

- differentiation in the neonatal rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* **14**, 45-55.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 123-129.
- Moriwaki H, Matsumoto M, Hashikawa K, Oku N, Ishida M, Seike Y, Fukuchi K, Hori M and Nishimura T (1998) Iodine-123-iomazenil and iodine-123-iodoamphetamine SPECT in major cerebral artery occlusive disease. *J Nucl Med* **39**, 1348-1353.
- Moss SJ and Smart TG (1996) Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol* **39**, 1-52.
- Mudrick-Donnon LA, Williams PJ, Pittman QJ and MacVicar BA (1993) Postsynaptic potentials mediated by GABA and dopamine evoked in stellate glial cells of the pituitary pars intermedia. *J Neurosci* **13**, 4660-4668.
- Muller V, Saur D, Klutmann S, Weiller C, Rother J and Clausen M (2002) Experience with ¹²³I-iomazenil SPECT in acute cerebral infarction. *Nucl Med Commun* **23**, 1191-1196.
- Naga Prasad SV, Jayatilleke A, Madamanchi A and Rockman HA (2005) Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **7**, 785-796.
- Nilsson M, Eriksson PS, Ronnback L and Hansson E (1993) GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes. *Neuroscience* **54**, 605-614.
- Niwa J, Kubota T, Chiba M, Mikami T and Oka S (2000) [Acute surgical and endovascular therapy for stroke: especially patients with brain infarction]. *No Shinkei Geka* **28**, 499-504.
- Nothacker HP and Clark S (2005) From heart to mind. The urotensin II system and its evolving neurophysiological role. *FEBS J* **272**, 5694-5702.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P and Mody I (1998) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* **395**, 172-177.
- Nutt DJ and Stahl SM (2009) Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. *J Psychopharmacol*.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A and Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* **26**, 13007-13016.
- Ohyama M, Senda M, Ishiwata K, Kitamura S, Mishina M, Ishii K, Toyama H, Oda K and Katayama Y (1999) Preserved benzodiazepine receptors in Alzheimer's disease measured with C-11 flumazenil PET and I-123 iomazenil SPECT in comparison with CBF. *Ann Nucl Med* **13**, 309-315.

- Ono T, Kawaguchi Y, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA, Guerrini R, Calo G and Hirota K (2008) Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett* **440**, 275-279.
- Pelligrino DA (2006) Regulation of the cerebral circulation. *J Appl Physiol* **100**, 3-4.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W and Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**, 815-850.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Gorman CM, Kettenmann H, Seeburg PH and Schofield PR (1988) Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABA(A) receptor subunits. *Science* **242**, 1306-1308.
- Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G and Leduc R (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* **385**, 115-123.
- Proulx CD, Holleran BJ, Boucard AA, Escher E, Guillemette G and Leduc R (2008) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol Pharmacol* **74**, 552-561.
- Pryor PR, Mullock BM, Bright NA, Gray SR and Luzio JP (2000) The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol* **149**, 1053-1062.
- Puia G, Vicini S, Seeburg PH and Costa E (1991) Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl- currents. *Mol Pharmacol* **39**, 691-696.
- Qi J, Du J, Tang X, Li J, Wei B and Tang C (2004) The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting. *Heart Vessels* **19**, 81-88.
- Rabow LE, Russek SJ and Farb DH (1995) From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* **21**, 189-274.
- Rakic P (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* **141**, 283-312.
- Rissman RA, Mishizen-Eberz AJ, Carter TL, Wolfe BB, De Blas AL, Miralles CP, Ikonomovic MD and Armstrong DM (2003) Biochemical analysis of GABA(A) receptor subunits alpha 1, alpha 5, beta 1, beta 2 in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease neuropathology. *Neuroscience* **120**, 695-704.
- Rupprecht R and Holsboer F (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-416.

- Russell FD (2004) Emerging roles of urotensin-II in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* **103**, 223-243.
- Salm AK and McCarthy KD (1992) The evidence for astrocytes as a target for central noradrenergic activity: expression of adrenergic receptors. *Brain Res Bull* **29**, 265-275.
- Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M and Witte OW (1996) Neuronal hyperexcitability and reduction of GABA_A-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 906-914.
- Schwartz-Bloom RD and Sah R (2001) gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* **77**, 353-371.
- Seifert G, Schilling K and Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* **7**, 194-206.
- Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Sieghart W (2006) Structure, pharmacology, and function of GABA_A receptor subtypes. *Adv Pharmacol* **54**, 231-263.
- Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H and Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron* **5**, 703-711.
- Silver J and Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* **5**, 146-156.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* **72**, 295-339.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M and Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 860-868.
- Taft JR, Vertes RP and Perry GW (2005) Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. *Int J Neurosci* **115**, 1333-1343.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X and Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* **9**, 260-267.
- Tateishi N, Shimoda T, Manako J, Katsumata S, Shinagawa R and Ohno H (2006) Relevance of astrocytic activation to reductions of astrocytic GABA_A receptors. *Brain Res* **1089**, 79-91.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H and Murakami O (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* **358**, 810-811.
- Tyndale RF, Hales TG, Olsen RW and Tobin AJ (1994) Distinctive patterns of GABA_A

- receptor subunit mRNAs in 13 cell lines. *J Neurosci* **14**, 5417-5428.
- Verheul HB, de Leeuw FE, Scholten G, Tulleken CA, Lopes da Silva FH and Ghijsen WE (1993) GABAA receptor function in the early period after transient forebrain ischaemia in the rat. *Eur J Neurosci* **5**, 955-960.
- Verkhratsky A and Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* **32**, 380-412.
- von Blankenfeld G, Turner J, Ahnert-Hilger G, John M, Enkvist MO, Stephenson F, Kettenmann H and Wiedenmann B (1995) Expression of functional GABAA receptors in neuroendocrine gastropancreatic cells. *Pflugers Arch* **430**, 381-388.
- Wafford KA, Whiting PJ and Kemp JA (1993) Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **43**, 240-244.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Brauton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF and Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* **388**, 686-690.
- Wang LC, Baird DH, Hatten ME and Mason CA (1994) Astroglial differentiation is required for support of neurite outgrowth. *J Neurosci* **14**, 3195-3207.
- Wang Q, Liu L, Pei L, Ju W, Ahmadian G, Lu J, Wang Y, Liu F and Wang YT (2003) Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* **38**, 915-928.
- Wang DD and Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* **86**, 342-367.
- Weinstein DE, Shelanski ML and Liem RK (1990) C17, a retrovirally immortalized neuronal cell line, inhibits the proliferation of astrocytes and astrocytoma cells by a contact-mediated mechanism. *Glia* **3**, 130-139.
- Wisden W, Korpi ER and Bahn S (1996) The cerebellum: a model system for studying GABAA receptor diversity. *Neuropharmacology* **35**, 1139-1160.
- Wolburg H, Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack A and Fallier-Becker P (2009) Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist* **15**, 180-193.
- Yoon KW (1994) Voltage-dependent modulation of GABA_A receptor channel desensitization in rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **71**, 2151-2160.
- Yu SY, Wu DC, Liu L, Ge Y and Wang YT (2008) Role of AMPA receptor trafficking in NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the rat lateral amygdala. *J Neurochem* **106**, 889-899.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW and Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* **22**, 155-168.

Legendes to Figures

Figure 1. Immunostaining of UT and GABA_AR γ subunits in rat cerebellum. (Aa and Ab) Double immunofluorescence labeling with the antibodies directed against rat UT (green) and against the specific astrocyte marker GFAP (in red, Aa), or the mature neuron marker NeuN (red, Ab) in astrocyte-neurone co-culture from P7 rat cerebellum. Astrocytes, recognized by strong GFAP staining shows UT immunoreactivity (arrowheads), whereas few weaker UT-stained cells lack GFAP (arrows). (Ab) Note the presence of faint UT labeling on mature granule cells (arrowheads). (Ac and Ad) Double immunofluorescence of UT (green) and of the γ_1 (Ac, red) or γ_2 (Ad, red) GABA_AR subunits in co-culture. Some UT immunopositive cells expressed γ_1 or γ_2 subunits (arrowheads) but UT was absent from γ_2 -positive bodies (arrow). Overlay of the images (Merge) are shown on the bottom rows. Each panel represents a stack from 3 confocal images at intervals of 0.1 μm visualized in maximal intensity projection mode. Scale bars, 50 μm . (B) Phase contrast photomicrograph of astrocytes in mono-, or of astrocytes and neurons in co-culture at 3 DIV. In mono-culture, flat astrocytes are proliferating whereas the presence of neurons in co-culture favors an astrocytic stellate phenotype and a relative quiescent state. (C) Membrane depolarization and currents evoked by the GABA_AR agonist isoguvacine (Iso) obtained in astrocytes and cerebellar granule neurons before, during *r*UII (10^{-7} M, 1 min) application and after 2-min washout. Right, summary of the *r*UII-induced inhibition of the GABAergic activity. Normalized amplitudes deduced by the mean Iso-evoked depolarization or current obtained before *r*UII application. (D) Concentration-response relationship of Iso-evoked currents recorded from cerebellar astrocytes in co-culture and corresponding curve fitted with a sigmoidal function yielding an EC₅₀ value of $43.6 \pm 23.7 \cdot 10^{-12}$ M. Note that *r*UII is efficient since 10^{-11} M, and that 10^{-8} M *r*UII induced a discernable inward, but the full reduction of the Iso current was seen before the onset of the inward current. Data are mean \pm SEM of 4 to 6 cells. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by a Mann and Whitney post hoc test.

Figure 2. Co-localization of UT-immunoreactivity in Neuron and glial components with γ subunits expressing cells in the rat cerebellum. (A-D) Immunohistochemical distribution of UT in glial processes and Purkinje cell bodies in molecular cell layer (ML), Purkinje cell layer (PCL) and in a less extent in the internal granule cell layer (IGL) in the cerebellar cortex

at P7, in parasagittal sections. Each panel represents a stack from 2 to 5 confocal images visualized in maximal intensity projection mode. A, Double-fluorescence staining for UT (green) and the specific marker of mature neurons NeuN (red) showing the presence of UT-positive cells lacking NeuN (arrowhead) or exhibiting NeuN-positive nucleus (arrows). (A') high magnification photomicrograph depicting the distribution of UT (green) and NeuN (red)-positive cells in the IGL. (B) Double-fluorescence staining for UT (green) and the specific marker of the Purkinje cells, calbindin (red) illustrating a clear co-localisation of UT with calbindin in Purkinje cells. (B') high magnification photomicrograph of UT (green) labeling prominent in calbindin-positive Purkinje cell soma and dendrites (red). (C) Double-fluorescence staining for UT (green) and the specific marker of migrating neuroblasts doublecortin (red) depicting a diffuse labeling in the ML contiguous along UT-positive fibers. (C') high magnification photomicrograph of UT (green) immunopositive fibers closely juxtaposed to doublecortin-expressing migrating granule cells (in red). (D) Double-fluorescence staining for UT (green) and the specific astrocyte marker GFAP (red) revealing the expression of UT in glial fibers. (D') high magnification photomicrograph confirming the distribution of UT (green) in glial GFAP-positive fibers (yellow, arrowhead) in the ML. (E and F) Immunohistochemical distribution of UT and the γ subunits of GABA_{AR} in the cerebellar cortex at P7, in a parasagittal section. Double-immunofluorescence staining for UT (green) and the γ_1 (E, red) or γ_2 (F, red) subunits of the GABA_{AR} detectable prominently in Purkinje cells and in a few extent in glial components (arrowhead) of the ML and IGL. Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars : 50 μ M (A-F); 20 μ m (A'-F'). EGL, external granule cell layer; ICL, internal granule cell layer; ML, molecular cell layer; PCL, Purkinje cell layer.

Figure 3. Effect of hUII on different subunit combinations of GABA_{AR}. (A) Typical Iso-evoked current recordings at the holding potential of -60 mV, in the whole cell configuration, illustrating concentration-dependent modulation of chloride current response in CHO stably expressing the human UT (CHO-UT) and transiently transfected with cDNAs encoding $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_1\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_1$, $\alpha_2\beta_1\gamma_1$, $\beta_3\gamma_2$, $\beta_1\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ subunits of the GABA_{AR}. Increasing concentrations of hUII were bath perfused and Iso (10^{-4} M) was repeatedly applied for 5 s at intervals of 90 s in the vicinity of cells expressing the different GABA_{AR} complexes. (B) Corresponding concentration-response curves for hUII on $\alpha_2\beta_1\gamma_2$ and $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_1\gamma_1$ and $\alpha_2\beta_3\gamma_1$, $\beta_1\gamma_2$ and $\beta_3\gamma_2$, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_2\beta_3$ receptor subunits. Note that when the γ_2 subunit is

associated to the GABA_{AR} complex, *h*UII is efficient since 10^{-13} M, excepted for $\beta_1\gamma_2$. Data are normalized to the control isoguvacine response immediately prior to lower *h*UII concentration application. Data are mean \pm SEM of 3 to 23 cells.

Figure 4. Pharmacological characterization of the UT-mediated inhibition of the GABA_{AR} currents. (A) Whole-cell current response to the GABA_{AR} agonist Iso recorded in the absence or presence of the GABA_{AR} allosteric modulator DMCM, of UT agonists *h*UII or URP, and of UT antagonists [*Orn*⁵]-URP or palosuran in CHO transiently transfected with cDNAs encoding α_2 , β_3 and γ_2 subunits. The UT agonists, *h*UII and URP (10^{-8} M, each), and antagonists, [*Orn*⁵]-URP and palosuran (10^{-6} M, each), failed to modulate current amplitudes evoked by Iso (10^{-4} M) whereas DMCM (10^{-5} M) markedly attenuated the response, indicating that γ_2 subunit formed, as expected, the recombinant GABA_{AR}. Below, summary of the *h*UII-induced inhibition of the GABAergic activity in CHO-GABA_{AR}. Data are normalized to the control isoguvacine response immediately prior to first *h*UII application ($n = 3-18$). (B) Comparison of the inhibitory effect of *h*UII (10^{-8} M) and DMCM (10^{-5} M) on CHO-UT-GABA_{AR} as illustrated in one representative cell, and in the summarized bar graphs ($n = 25$). Bottom row, plot of the correlation of *h*UII-induced inhibition as function of the DMCM-evoked decrease of the currents ($n = 28$). The r^2 indicates a significant positive correlation between these two types of inhibitions. (C) Comparison of the inhibitory effect of *h*UII (10^{-8} M) and URP (10^{-8} M) on CHO-UT-GABA_{AR} shown in one representative cell, and in the summarized bar graphs, indicating a similar acute but more reversible effect of URP comparing with *h*UII ($n = 12-54$). (D) Representative cell example of the effect of [*Orn*⁵]-URP (10^{-6} M) in the absence or presence of *h*UII (10^{-8} M) versus the effect of *h*UII alone. Right, summary of the effect of each ligand indicating that [*Orn*⁵]-URP but in a less extent as URP, counteracting the acute effect of *h*UII ($n = 3-54$). (E) Representative cell example of the effect of palosuran (10^{-6} M) in the absence or presence of *h*UII (10^{-8} M) versus the effect of *h*UII alone. Right, summary of the effect of each ligand indicating that palosuran markedly inhibited, as *h*UII, the Iso-evoked current, counteracting the sustained effect of *h*UII ($n = 7-54$). Data are mean \pm SEM from 9 to 54 cells. ns, non significant, *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by Mann and Whitney post hoc test.

Figure 5. Role of specific UT ligands on the cytosolic calcium in CHO-UT. Continuous recording of cytosolic calcium concentration $[Ca^{2+}]_c$ given by the ratio of Fura-2 AM fluorescence at 340 and 380 nm (340/380 nm). (A and B) *hUII* (A) or URP (B) (10^{-8} M, each) applied for 1 min provokes a robust increase of $[Ca^{2+}]_c$, which remains stable along the recording period for *hUII* (A), or recovers to the basal line level for URP (B). Note remaining spiking cells in the case of URP. Bar graphs represent the percent increase of the $[Ca^{2+}]_c$ during *hUII* (A) or URP (B) perfusion, and after 16 min and 32-min washout. (C and D) $[Orn^5]$ -URP (10^{-6} M, C) or palosuran (10^{-6} M, D) application, before and during *hUII*, a control peptide perfusion being tested (1 min) after a washout period. Short application (1 min) of $[Orn^5]$ -URP evokes a highly reversible $[Ca^{2+}]_c$ increase, and blocks the sustained effect of *hUII*. A 4 min perfusion of palosuran and a combination of palosuran and *hUII*, did not stimulate the $[Ca^{2+}]_c$ rise, whereas a consecutive *hUII* perfusion weakly and slowly induces cell responses. Bar graphs represent the percent increase of the $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of $[Orn^5]$ -URP or palosuran, in the absence or presence of *hUII* and (A) or URP (B) perfusion, and after 16 min and 32-min washout. Percent values were obtained by normalizing signals evoked during and after treatments to the value measured before ligand application. Data are mean \pm SEM from 9 to 25 cells. ns, non significant; *, P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by Friedman post hoc test.

Figure 6. UII-induced fast current inhibition and GABA_{AR} desensitization. Currents evoked by Iso were recorded in the whole-cell configuration at the holding potential of -70 mV on CHO-UT co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ subunits of the GABA_{AR}. (A and B) Superimposed Iso-evoked current traces recorded from a single cell. (A) Examples of currents recorded from voltage-clamped membrane patches during a long desensitizing pulse (25 s) of Iso (10^{-4} M), in the absence (black) or presence (green) of *hUII* (10^{-8} M, 1 min). Exponential fit to the desensitizing current phases are shown overlaid on the currents. Current decay during desensitization was best fitted with one exponential yielding time constant τ of 11.31 ± 0.03 s in control, and 8.86 ± 0.01 s in the presence of *hUII*. Bar graphs corresponding to the average desensitization constant parameter τ in the absence of presence of *hUII*, (n = 5). (B) In each series, prolonged Iso (30 s) application eliciting current desensitization followed by a time course of the recovery from desensitization, in the absence (control) or presence of *hUII* (10^{-8} M). The recovery was monitored by a brief pulse of Iso (1 s) applied at incremental intervals

(5-s steps) immediately after the end of the 25-s agonist application. The graph represents the time-course of the recovery from desensitization. The relative amplitude of the Iso-evoked current is expressed as a fraction of the peak control current induced by the long Iso application to the current amplitude elicited by each short pulse, and plotted against interpulse intervals. (C) Traces of repeated short pulses of Iso (10^{-4} M, 1 s) at 10-s intervals in CHO or CHO-UT transiently transfected with cDNAs encoding $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} subunits (CHO-GABA_{AR} or CHO-UT-GABA_{AR}). When the desensitized fraction of the current is overcame, *hUII* (10^{-8} M, 1.5 min) and/or DMCM (10^{-5} M, 1.5 min) were bath perfused on CHO-GABA_{AR} and/or on CHO-UT-GABA_{AR}, respectively. Corresponding normalized current amplitude of the above experiment. Average time course current amplitudes before, during and after *hUII*- and/or DMCM-induced effects. Data are mean \pm SEM from 3 to 8 cells. ns, non significant; *, P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by Freidman (C) or Mann and Whitney (D) post hoc tests.

Figure 7. Intracellular mechanisms of UT-triggered GABA_{AR} inhibition. (A) Currents evoked by Iso (10^{-4} M, 5 s) were recorded for a long session period in the whole-cell configuration at the holding potential of -70 mV. Traces of Iso-evoked current amplitude time-course on CHO-UT co-expressing $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} subunits, in control (above row) or during a 1-min application of *hUII* (10^{-8} M, bottom row). Corresponding average time course of the iso-evoked current, in control (filled diamond) or during and after a 1-min *hUII* application (open diamond). The peptide induced a fast short-term inhibition during agonist application, and a long-term run-down along washout period (>20 min). (B and C) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 1-min *hUII* (10^{-8} M) application and after 20 min washout (3), in the absence (open circles) or presence of intracellular dialyzing non-hydolysable analog of GDP, GDP- β -S ((B, filled circles, 10^{-4} M) or of the cocktail of kinase and phosphatase inhibitors (C, KIC) bath perfused. In the bottom rows are represented the corresponding average time course of the iso-evoked current, in the absence (filled circles) or presence (open diamond) of GDP- β -S (B) or KIC (C). (D) $[Ca^{2+}]_c$ fluorescence images of the cultured CHO-UT-GABA_{AR} preloaded with Fura-2 AM (2 μ M), and intracellularly dialyzed with Fura-2 KCl (2 μ M) as illustrated in the first image, during the patch-clamp recording session. Representative imaging field before, during *hUII* (10^{-8} M) application and during washout, and time-course of the fluorescence ratio 340/380. Number above the curve indicate

the corresponding fluorescent image. The bottom row shows simultaneous chloride currents evoked by repetitive Iso (10^{-4} M, 5 s) applications, the time scale being enlarged to show that the current inhibition occurs before the *h*UII-induced $[Ca^{2+}]_c$ rise. (E) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 1-min *h*UII (10^{-8} M) application and after 20 min washout (3), in the absence (open circles) or presence (filled circles) of an intrapipette Ca^{2+} -free solution (BAPTA, 10^{-3} M). In the bottom rows are represented the corresponding average time course of the iso-evoked current, in the absence (filled circles) or presence (open circles) of BAPTA. After rapid Ca^{2+} chelation, *h*UII-induced fast short-term inhibition during agonist application, is followed by a plateau phase along the washout period (>20 min). (F) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 1-min *h*UII (10^{-8} M) application and after 20 min washout (3), in the absence (open circles) or presence of intracellular dialyzing of the dynamin inhibitory peptide (DIP, 10^{-5} M). Note that DIP totally blocks the *h*UII-induced current run-down. In the bottom rows are represented the corresponding average time course of the iso-evoked current, in the absence (filled circles) or presence (open circles) of BAPTA (E) or DIP (F). Numbers below traces indicate the time of recording, 1 min-before (1), during *h*UII (2) application and after 22-min washout (3). Data are mean \pm SEM from 3 to 21 cells. ns, non significant; *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by a Mann and Whitney post hoc test.

Figure 8. UT activation mediating GABA_AR internalization. (Aa-d) CHO-UT cells transiently transfected with cDNA encoding $\alpha_2\beta_3^{HA}\gamma_2$ GABA_AR subunits. Expressed GABA_AR- β_3^{HA} were prebound ($4^{\circ}C$, 30 min) with anti-HA antibody. Excess antibodies were removed and cells were incubated at $37^{\circ}C$ for 60 min. Cells were then fixed, and cell surface receptors were detected in the absence of permeabilization with Alexa-488-conjugated secondary antibody (green). The cells were then permeabilized with 0.05% Triton X-100 and internalized antibody was measured using a secondary antibody conjugated with Alexa-594 (red). Significant internalization could be detected for β_3^{HA} subunit in control (Aa) or after 60 min of *h*UII 10^{-8} M (Ab), Iso 10^{-4} M (Ac) or *h*UII+Iso (Ad). Fluorescence intensity plots of green and red fluorescence corresponding to the localization of GABA_AR (β_3^{HA}) at the plasma membrane and in the cytosol, respectively, across the regions delimited by the white lines scans. A.u., arbitrary unit; Scale bars, 25 μ M. (B) Bar graphs of the fraction of fluorescence at the plasma membrane on CHOT-UT-GABA_AR (grey square) or CHO-GABA_AR (white

square), in the absence or presence of *hUII* (10^{-8} M), Iso (10^{-4} M) or *hUII+Iso*. The percentage of membrane fluorescence was calculated by averaging the intensity values obtained when the line cross the plasma membrane, further normalized to the intensity value taken at the half of the distance between these two crossing points, corresponding to the cytosolic receptor fraction. Each bars correspond to mean \pm SEM percent obtained from 3 to 18 cells. ns, non significant; ***, P < 0.001; CHO –UT-GABA_A *versus* control; #, P < 0.001, CHO-GABA_{AR} *versus* control. One-way ANOVA followed by a Mann and Whitney post hoc test.

Figure 9. Receptor sequences involved in UT regulation of the GABA_{AR} activity.

(A) Schematic diagrams mixed with sequence alignments illustrating the HA epitope-tagged human UT, C-terminus truncated UT^{HA}₃₇₀, UT^{HA}₃₅₁, UT^{HA}₃₃₂, UT^{HA}₃₁₉ mutants, and peptidomimetics corresponding to the entire C-terminus cytosolic fragment of UT (UT^{c-myc}₃₁₉₋₃₈₉) or to the intracellular loops of the α_2 , β_3 and γ_2 GABA_{AR} subunits (α_2^{c-myc} -i₂, β_3^{c-myc} -i₂ and γ_2^{c-myc} -i₂). (B) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 1-min *hUII* (10^{-8} M) application and after 22 min washout (3), recorded from CHO co-expressing UT^{HA} and the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} (open diamond), UT^{HA}₃₇₀ (filled circles), UT^{HA}₃₅₁ (filled diamond), UT^{HA}₃₃₂ (filled triangle) and UT^{HA}₃₁₉ (filled square). Corresponding average time course of the Iso-evoked current, in the absence (open diamond) or presence of UT truncated mutants. Note that the most distal portion of the C-terminus relays the inhibition of the current. (C) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 1-min *hUII* (10^{-8} M) application and after 22 min washout (3), recorded from CHO-UT co-expressing the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR}, in the absence (open diamond) or presence of UT^{c-myc}₃₁₉₋₃₈₉ (filled circles). Corresponding average time course of the Iso-evoked current, in the absence (open diamond) or presence of UT^{HA}₃₁₉₋₃₈₉ indicating that the UT C-terminus holds GABA_{AR} regulating sequence interaction. (D) Traces of Iso (10^{-4} M)-evoked current before (1), during (2) a 40-1-min *hUII* (10^{-8} M) application and after 22 min washout (3), recorded from CHO-UT co-expressing the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ GABA_{AR} subunits, in the absence (open diamond) or presence of the α_2^{c-myc} -i₂ (open diamond), β_3^{c-myc} -i₂ (filled triangle), or γ_2^{c-myc} -i₂ (filled circles). Corresponding average time course of the Iso-evoked current, in the absence (open diamond) or presence of the GABA_{AR} subunit intracellular loops. These peptidomimetics failed to counteract the fast short-term current inhibition but attenuate the run-down phenomenon. In B and D, significance was only annotated above the time course graph during *hUII* perfusion and after 18-min washout, for clarity. Data are mean \pm SEM from 3 to 13 cells. ns, non significant; *, P < 0.05; ** P < 0.01;

*** P < 0.001 compared with the corresponding control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by a Friedman post hoc test.

Figure 10. Schematic model depicting the mechanism of UT-mediated GABA_AR down-regulation. UII efficiently activates the G protein-coupled receptor UT, leading to a fast short-term decrease of the chloride current, independently of G proteins, calcium, phosphorylation and endocytosis processes, and involving the last 19 amino acids of the UT C-terminus and γ subunits of the GABA_AR complex (1). During the washout period, a long-term inhibition develops *via* a dynamin-dependent internalization, requiring at least in part the 351-370 sequence of UT and γ subunits, and calcium- and phosphorylation-dependent endocytic mechanisms (2). By extrapolation, it is hypothesized that directional cross-talk between UT and GABA_AR, and the extinction of the latter at the plasma membrane, relays at least in part, transition between quiescence to reactivity in astrocytes.

Legends to supplementary Figures

Table S1. Primer sequences and Restriction enzymes used for the different UT and GABA_AR subunits constructions.

Table S2. EC₅₀ and maximum inhibitory effects of hUII on different GABA_AR subunit combinations. EC₅₀ and mean percentage inhibition of the Iso-evoked current by hUII 10⁻¹² and 10⁻⁷ M, corresponding to the concentration response curves of Fig. 3B, individually determined for each cell. Data for the EC₅₀ values are presented as the mean ± SEM of 3 to 6 cells. ND, not determined. The Pearson coefficient r² closed to 1 is used for significance.

Figure S1. Pharmacological and gating properties of hUII-induced regulation of GABA_AR. (A) Whole-cell current response to the GABA_AR agonist Iso recorded in the absence or presence of the GABA_AR allosteric modulator pentobarbital, the GABA_AR antagonist SR95531 and the chloride channel blocker picrotoxin in CHO transiently transfected with cDNAs encoding α₂, β₃ and γ₂ subunits. Bath perfusion of pentobarbital (10⁻⁵ M) provokes an opening of the chloride channel associate with the GABA_AR and potentiates Iso (10⁻⁴ M)-evoked current whereas SR95531 (10⁻⁵ M) and picrotoxin (10⁻⁴ M) markedly depressed the GABA_AR response. Below, summary of the hUII-induced inhibition of the GABAergic activity in CHO-GABA_AR. (B) Current traces of Iso (10⁻⁴ M)-evoked at potentials varying from -80 to +60 mV by 20 mV steps, in the absence (control) or presence of hUII (10⁻⁸ M). Current-Voltage (I-V) relationship of the Iso-evoked current. Chloride concentration in the patch pipette was closed that of the extracellular solution (EqCl ≈ 0 mV). Iso current amplitudes were measured at the peak and plotted against the membrane potential to construct the graph. Data are mean ± SEM from 5 to 9 cells. ns, non significant; *, P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 compared with the control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by Mann and Whitney post hoc test.

Figure S2. Co-localization of UT with GABA_A receptor in CHO-transfected cells. Representative confocal microscope images of permeabilized CHO cells co-expressing UT^{HA} (green) and the GABA_AR α₂β₃γ₂^{c-myc} (red) in the absence (control, A) or presence of UII (10⁻⁸ M, B), GABA (10⁻⁴ M, C) or UII+GABA (D). Cells were immunostained for the γ₂^{HA} GABA_AR subunit (anti-HA) and for UT^{c-myc} (anti-c-myc) or the merge (yellow). Under

control condition, UT and the GABA_{AR} γ_2 subunit were mainly expressed at the plasma membrane. In contrast, in the presence of UII, GABA or in both instances (10 min), UT and GABA_{AR} are both relocated throughout the cytoplasm (white dashed arrow) and at the plasma membrane (white plain arrow), as also seen in the merged panel (yellow). Scale bars, 25 μ M.

Figure S3. Functional expression of the UT C-terminus truncated mutants. (A) CHO transiently expressing UT^{HA} (filled diamond), UT^{HA}₃₁₉ (filled square), UT^{HA}₃₃₂ (open square), UT^{HA}₃₅₁ (filled triangle), UT^{HA}₃₇₀ (open circle) were loaded with Fluo-4 AM (40 min) and exposed to graded concentrations of *h*UII (10^{-13} - 10^{-7} M). Dose-response curve of the mean of maximum amplitude of $[Ca^{2+}]_c$ transient induced by *h*UII of at least 3 independent experiments. The results are expressed as percentages of the corresponding control values in the absence of *h*UII. (B) Corresponding table summarizing EC₅₀ values and percentage of efficacies of the effect of *h*UII on each UT constructions. Data are mean \pm SEM from 3 independent experiments in duplicates. ns, non significant; *, P < 0.05; ** < 0.01; *** P < 0.001 compared with the control Iso-evoked current. One-way ANOVA followed by a Mann and Whitney. (C) Confocal microscope images of permeabilized CHO expressing UT^{HA} and the different UT^{HA} truncated forms (green).

Materials and Methods

Animals

Wistar rats (Depré, Saint-Doulchard, France) were kept in a temperature-controlled room ($21\pm1^\circ\text{C}$), under an established photoperiod (lights on 07.00-19.00 h) with free access to food and tap water. Animal manipulations were performed according to the recommendations of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

Primary Cell Culture

Astrocytes

Primary cultures of astrocytes were prepared as previously described (Gandolfo *et al.* 1997). Briefly, cerebellum from 7-day-old (P7) Wistar rats were collected in DMEM/Ham-F12 (2:1, v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% D(+)-glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. The tissues were disaggregated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle, and filtered through a 100- μm pore size mesh filter (Falcon, Becton Dickinson, Grenoble, France). Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and seeded in 150- cm^2 culture flasks (Falcon) at a density of 20×10^6 cells/flask. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO_2) and the medium was changed twice a week. When cultures were confluent, the flasks were gently shaken on an orbital shaker at 250 rpm for 2 h. Dislodged cells were discarded and a second step of purification was performed at 250 rpm for 14-16 h. Remaining adhesive cells were collected by trypsinization, centrifuged (800 rpm, 10 min) and plated in 150- cm^2 flasks. Suspended astrocytes were harvested and seeded in 24-well poly-L-lysine-coated plates. The purity of the cultures was previously assessed by counting the percentage of astrocytes immunostained with GFAP antibodies. The enriched cultures contained >99% astrocytes (Castel *et al.*, 2006).

Co-culture astrocytes-neurons

Granule cell cultures were prepared from cerebella of 7-day-old Wistar rats as described previously (Lefebvre *et al.*, 2009). Isolated cells were plated on 14-mm culture dishes coated with poly-L-lysine (5 mM) at a density of 1.5×10^6 cells/dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO_2) for 1 to 10 days before use. Culture medium consisted of DMEM/Ham's F12 (75%/25%) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 25 mM KCl and 1% of antibiotic-antimycotic solution. Co-cultures are obtained by

seeding granule cells (1.5×10^6 cells/ml) on cerebellar astrocytes plated in 24-well plates after 12 hours. Co-cultures are maintained in the specific medium for neuron and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO₂) for several days.

CHO recombinant cell line and plasmid transfection

CHO-K1 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human UT stable CHO (CHO-UT) was generated by CHO electroporation with 20 µg pIRES-neo2-UT DNA and 500 µg sterile sonicated salmon sperm DNA using the EasyJect One electroporation system (Equibio, Angleur, Belgium), followed by repetitive rounds of limiting dilution of cells in G418 (400 µg/ml) for selection (Chatenet *et al.*, 2004). Normal or Stable CHO were grown in Ham-F12 medium supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic-antimicotic solution and 2 mM glutamine, at 37°C in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO₂. The stable CHO-UT medium was supplemented with the antibiotic G418 (40 µg/ml).

For transfection, cells were trypsinized (0.05%), triturated in HamF-12 containing 10% FBS media, pelleted by centrifugation, resuspended in 100 µl solution V for nucleofection by an Amaxa Nucleofector Device (Köln, Germany; set to program U-016). Experiments were performed on normal CHO-K1 cells or on the stable CHO-UT and transiently transfected with combinations of cDNA coding GABA_AR subunits α₂β₃γ₂, α₂β₃γ₁, α₂β₁γ₂, α₂β₃γ₁, α₂β₃, β₃γ₂ (4 µg of cDNA total/transfection). Cells were seeded on 14-mm poly-L-lysine-coated glass bottom insert dishes at 5×10^5 cells in a volume of 0.5 ml/dish. Cells were incubated overnight at 37°C in a humidified incubator (5% CO₂) during 16h before electrophysiological or immunocytochemical experiments.

Receptor constructions

The stable cell line CHO-expressing human UT was obtained from Dr Dubessy (Inserm U982, France), as described previously (Chatenet *et al.*, 2004). For UT epitope-tagged with HA and c-Myc, UT-HA or UT-c-myc, human UT receptor cDNA inserted into pcDNA3.1 (Ressource Center, MI, USA) was amplified and PCR products were subcloned using the EcoRI and XhoI sites of pCMV-HA or pCMV-C-myc (BD Biosciences Clontech, Mississauga, ON, Canada) after digestion by the same restriction enzymes (Table S1). Mutagenesis was confirmed by automated nucleotide sequencing. Mutant UT receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (Expand High Fidelity PCR System; Roche) using the human UT receptor cDNA inserted into pcDNA3 as a template.

Two sets of forward and reverse oligonucleotides were used (Table S1) to introduce stop codons at Leu370, Phe351, Gly332 and Thr319 (to generate UT₃₇₁, UT₃₅₀, UT₃₃₂ and UT₃₁₉, respectively). PCR products were subcloned using the EcoRI and XhoI sites of pCMV-HA after digestion by the same restriction enzymes.

GABA_A receptor cDNA clones; α_2 , β_1 , β_3 , γ_1 and γ_{2L} engineered into the expression vector pCDM8 (α_1 , β_1 , γ_2) or pcDNA/Amp (β_3 , γ_1) were generously provided by Dr Wingrove (Merk Sharp and Dohme, Harlow, UK). To obtain α_2^{c-myc} , β_{32}^{c-myc} and γ_{2L2}^{c-myc} epitope-tagged subunits, α_2 , β_3 and γ_{2L} cDNA inserted were amplified and PCR products were subcloned using the SalI and NotI sites of pCMV-C-myc (Table S1) after digestion by the same restriction enzymes (Table S1).

Construction of the mini-peptides corresponding to the C-terminus UT (UT^{c-myc}₃₁₉₋₃₈₉), and to α_2 , β_3 or γ_{2L} cytoplasmic loop regions cDNA encoding fragments α_2^{c-myc} -i₂, β_3^{c-myc} -i₂ or γ_2^{c-myc} -i₂ were amplified by PCR. All 5' and 3' oligonucleotides incorporated SalI and NotI sites, respectively, to facilitate subcloning into pCMV-C-myc, and incorporated initiation and stop codons where appropriate (Table S1).

Cell Immunofluorescence

Immunocytochemistry on co-culture

Co-cultures astrocytes-neurons on coverslips were washed three times in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 20 min, and washed three times in PBS. Cells were permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 (10 min) and pre-incubated with normal goat and/or normal donkey antiserum (1:50, Santa-Cruz, Tebu bio, Le Perray En Yvelines, France) for 1h. Then, cells were incubated at 20°C for 1 h with a goat anti-UT (1:200), an mouse anti-NeuN (1:200, Santa-Cruz), an rabbit anti-GFAP (1:1000, Dako, Trappes, France), or rabbit anti- γ_1 and γ_2 GABA_AR subunit (1:200, generous gift from Dr Sieghart, Brain Research Institute, Vienna, Austria). Specificity of the UT immunolabelling on astrocytes has already been demonstrated (Castel et al., 2006). After several rinses in PBS, cells were incubated at 20°C for 2h with Alexa 488-conjugated donkey anti-goat diluted 1:300 and anti-Alexa 594-conjugated donkey anti rabbit IgGs.

Receptor cell surface internalization

For double-immunofluorescence, non-permeabilized living CHO cells expressing the UT-HA and/or the $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ -c-myc GABA_A receptor were washed two times in PBS, and incubated with monoclonal mouse anti-myc and rabbit polyclonal anti-HA (1:200, Santa-cruz) for 1h on ice in DMEM (Connolly et al., 1999). Excess antibody was removed and cells were incubated with the different receptor agonists for 30 min at room temperature (RT). After several rinses in PBS, cells were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 20 min, washed three times in PBS and then incubated at RT for 2h with appropriate secondary antibodies, *i.e.* Alexa-488- and 594-conjugated donkey anti-mouse IgGs diluted 1:300. After washing, coverslips were incubated in DAPI (1/10000), washed again and mounted in Eukitt (VWR International, Strasbourg, France).

All preparations were examined using a confocal laser-scanning microscope (Leica, Heidelberg, Germany) equipped with a Diaplan optical system, a UV laser (excitation wavelength 405 nm) and argon/krypton ion (excitation wavelengths 488/594 nm) laser.

Immunohistochemistry on cerebellar sections

Following decapitation, the cerebellum of 7 days old Wistar rats was extracted and immersed in iced PBS. Cerebella of 7-day-old rats were sectioned transversely into 180 µm-thick slices on a vibrating blade microtome (VT1000S, Leica Instruments). The slices were subsequently washed in PBS (pH 7.4) and postfixed in a 4% PFA solution for 20 min. Thereafter, free-floating sections were rinsed and non-specific binding was blocked by 10% normal donkey serum, 0.1% BSA and 0,3% Triton X-100 in PBS for 1h. The tissue sections were incubated overnight at 4°C with a goat antiserum directed against rat UT (1:200, Santa Cruz), a mouse anti-calbindin (1:400, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), a mouse anti-GFAP (1:1000, Dako), a mouse anti-NeuN raised in mouse (1:200, Santa-Cruz), an anti-doublecortin raised in goat (1:400, Santa-Cruz), or an anti- γ_1 or anti- γ_2 GABA_AR subunit (1:200, Brain Research Institute). The sections were rinsed three times with PBS and incubated for 2h at room temperature with Alexa 488- or 594-conjugated donkey anti-rabbit, donkey anti-goat or donkey anti-mouse (1:200, Invitrogen, Boulogne Billancourt, France). After washing, slices were incubated with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:10000, Sigma-Aldrich) for 5 min to label nuclei. Finally, the sections were rinsed in PBS, and mounted with mowiol. The preparations were examined on a Leica SP2 upright confocal laser scanning microscope (DM RXA-UV) equipped with Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) system. For confocal

images, Alexa 488 and Alexa 594 were excited respectively at 488 and 594 nm. To study the specificity of the UT immunoreactivity, the following controls were performed: (1) substitution of antisera with PBS and (2) preincubation for 12 h of the UT antiserum with the blocking peptide (10 µM) (Santa-Cruz).

Electrophysiology

The conventional whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to study the GABA-gated currents in astrocytes and granule neurons, UT stably transfected CHO, CHO-UT and CHO transiently transfected with diverse variants of UT and GABA_AR subunits. After 24h transfection, cell culture coverslips were placed in a small chamber (1.5 ml) on a stage of a right microscope DMLFSA (Leica, Heidelberg, Germany) and superfused continuously with the following bath solution containing (in mM): NaCl, 150; KCl, 2.5; HEPES, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 10 (pH 7.4 adjusted with NaOH). The patch pipettes were fabricated from 1.5 mm (outer diameter) soft glass tubes on a two-step vertical pipette puller (List-Medical, L/M-3P-A, Darmstadt, Germany). Patch electrodes had a final resistance of 4-6 MΩ when filled with an internal pipette solution containing (in mM): KCl, 130; MgCl₂, 2; CaCl₂, 0.5; EGTA, 5; HEPES, 10; ATP, 1; GTP, 0.1 (pH 7.4 adjusted with KOH). ATP and GTP were added to the internal solution used to fill electrode just before recording. All recordings were obtained at room temperature with cells voltage-clamped at -70 mV. The GABA_A receptor agonist isoguvacine was prepared in the extracellular solution and was applied to cells by pneumatic pressure ejection. To prevent desensitization, isoguvacine was applied during 5 s at 2-min intervals. ATP, GTP, or GDPβS were administered through the patch pipette solution. All peptide ligands, inhibitors or allosteric modulators of the GABA_A receptor function were applied *via* gravity through a plastic tubing positioned in the vicinity of the cell body in order to maintain a sustained perfusion. In these conditions, drugs could reach the cell of interest after 30 s of perfusion. Isoguvacine was applied focally by pneumatic pressure ejection from a micropipette.

All current signals were amplified from an Axopatch 200A Amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA) and filtered at 2 kHz (3 dB, four-pole, low-pass Bessel filter). Data acquisition and analysis were performed through a digitata 1200 interface using the pClamp 8 suite programs (Axon Instruments, Union City, CA, USA) and/or the Origin 4.1 analysis software (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

The decrease of the chloride current (normalized current, I) was defined as $(I\text{-Iso} + I\text{-UII})/Iso - 1$ where I-Iso + UII is the current response in the presence of various concentrations

of UII and I-Iso is the control GABA_AR current. Concentration response curves were generated and the data were fitted by a non-linear regression analysis using Microcal Origin Software. Dose-response curves were fitted using a nonlinear square-fitting program to the equation: $F(x) = B_{max}/[1 + (EC_{50}/x)^n]$, where x is the drug concentration, EC_{50} is the concentration of drug eliciting a half-maximal response and n is the Hill coefficient.

All values are given as means \pm SEM and tests used are given in the legends to figures.

Cell calcium imaging

For cell calcium imaging, Fura-2 AM (5 mM, Molecular Probe; Fisher, Cergy-Pontoise, France) was dissolved in 20% pluronic F-127 (w/v, DMSO) and then added to culture medium at a final concentrations of 5 μ M and 0.02%, with 2.5 mM probenecid (Sigma-Aldrich) respectively. Cells were incubated in the dye solution for 1h at a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂) and then rinsed in the standard extracellular solution used for patch-clamp experiments. For simultaneous measurements of intracellular calcium and chloride-evoked currents in CHO, patch-clamp electrodes were filled with an internal solution containing : KCl, 140; MgCl₂, 4; fura-2, 0.25; HEPES, 10; ATP, 1; GTP, 0.1 (pH 7.4 adjusted with KOH). Fluorescence images were acquired with the right microscope DMLFSA (Leica) equipped with a digital CCD camera Coolsnap HQ (Photometrics, Roper scientific, Evry, France). A high-speed scanning polychromatic light source was used for alternate excitations at wavelenghts of 340 and 380 nm. The fluorescence intensities at both wavelenghts (F340 and F380) were measured every 500 ms. Image acquisition and analysis were obtained with a MetaFluor/Metamorph Imaging System (Roper scientific). The ratio between the two images was proportional to the $[Ca^{2+}]_c$ in the cell under study. Before an experiment, the bath ground level of fluorescence (attributable to autofluorescence and camera noise) was determined and systematically subtracted.

Calcium mobilization assay

CHO cells stably transiently transfected with the human UT-HA or their truncated forms were plated at a density of 4×10^4 cells/well in flat clear bottom black 96-well plates. After 24 h in culture, cells were incubated at 37°C with 40 μ l of 2 μ M fluo-4 AM dye containing 20% pluronic acid for 40 min in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were washed twice with modified HBSS, and the effects of graded concentrations of UII on $[Ca^{2+}]_c$ were measured with a fluorometric imaging plate reader FlexStation II (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) during

150 s with an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 525 nm. After 18 s recording in basal conditions, 50 µl of graded concentration of UII (four-fold final concentration) was added to the incubation medium with a built-in eight-channel pipettor to assess activity. After subtraction of mean fluorescence background, baseline was normalized to 100%. Fluorescence peak values were determined for each concentration of UII potency (IC_{50}) and efficacy (E_{max}) were calculated with the Prism 4.0 software using a logistic equation to fit peak fluorescence data and results were expressed as mean ± SEM.

Chemicals

Rat UII (*r*UII, *p*QHGTAPECFWKYCI), human UII (*h*UII, ETPDCFWKYCV), URP and [Orn^5]URP were synthesized by the solid phase methodology on a Pioneer PerSeptive Biosystem peptide synthesizer (Applera France, Courtabœuf, France) using the standard manufacturer's procedures as previously described (Labarrère et al. 2003; Chatenet et al. 2004). All peptides were purified on a 2.2 X 25-cm Vydac C₁₈ column (Alltech, Templemars, France) (>98% pure) and characterized by MALDI-TOF MS on a Voyager DE-PRO mass spectrometer (Applera France). DMEM, glutamine, HEPES and the antibiotic-antimycotic solution were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). ATP, GTP, guanosine 5'-[β thio]triphosphate (GDP- β -S), the GABA_A receptor agonist isoguvacine, pentobarbital, methyl 6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-3-carboxylate (DMCM), a phosphatase inhibitor cocktail 2 (sodium vanadate, sodium molibdate, sodium tartrate and imidazole, Quercetin, staurosporine), picrotoxin, SR95531, Ham-F12, insulin, D(+)-glucose, Tri reagent, probenecid, and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma. FBS was from Eurobio (France). The goat antiserum against rat UT, the rabbit antisera against human, mouse and rat UT, calbindin, the HA epitope tag, and the mouse antiserum against the c-myc epitope tag, the rabbit NeuN and the rabbit GFAP antiserum were from Santa Cruz. The anti- γ_1 and - γ_2 subunits of the GABA_AR are generous gifts from Dr W. Sieghart (Section of Biochemical Psychiatry, University Clinic for Psychiatry, A-1090 Vienna, Austria). Pluronic acid and Fura-2 pentapotassium salt and Fura-2 acetoxyethyl ester (Fura-2 AM) were from Molecular Probes (Leiden, Netherlands). The dynamin inhibitory peptide (DIP) was obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MI, USA).

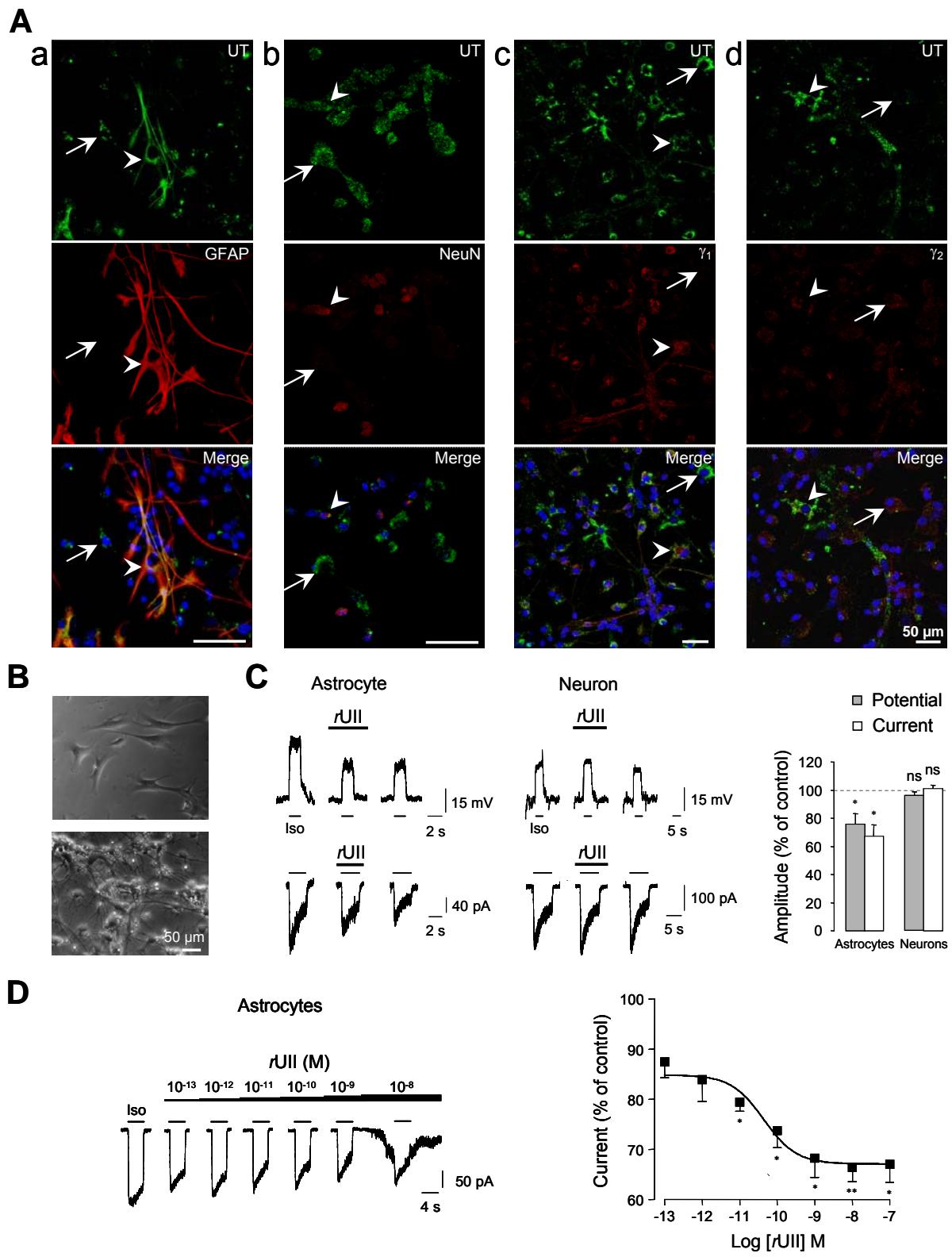


Figure 1
Lefebvre et al.

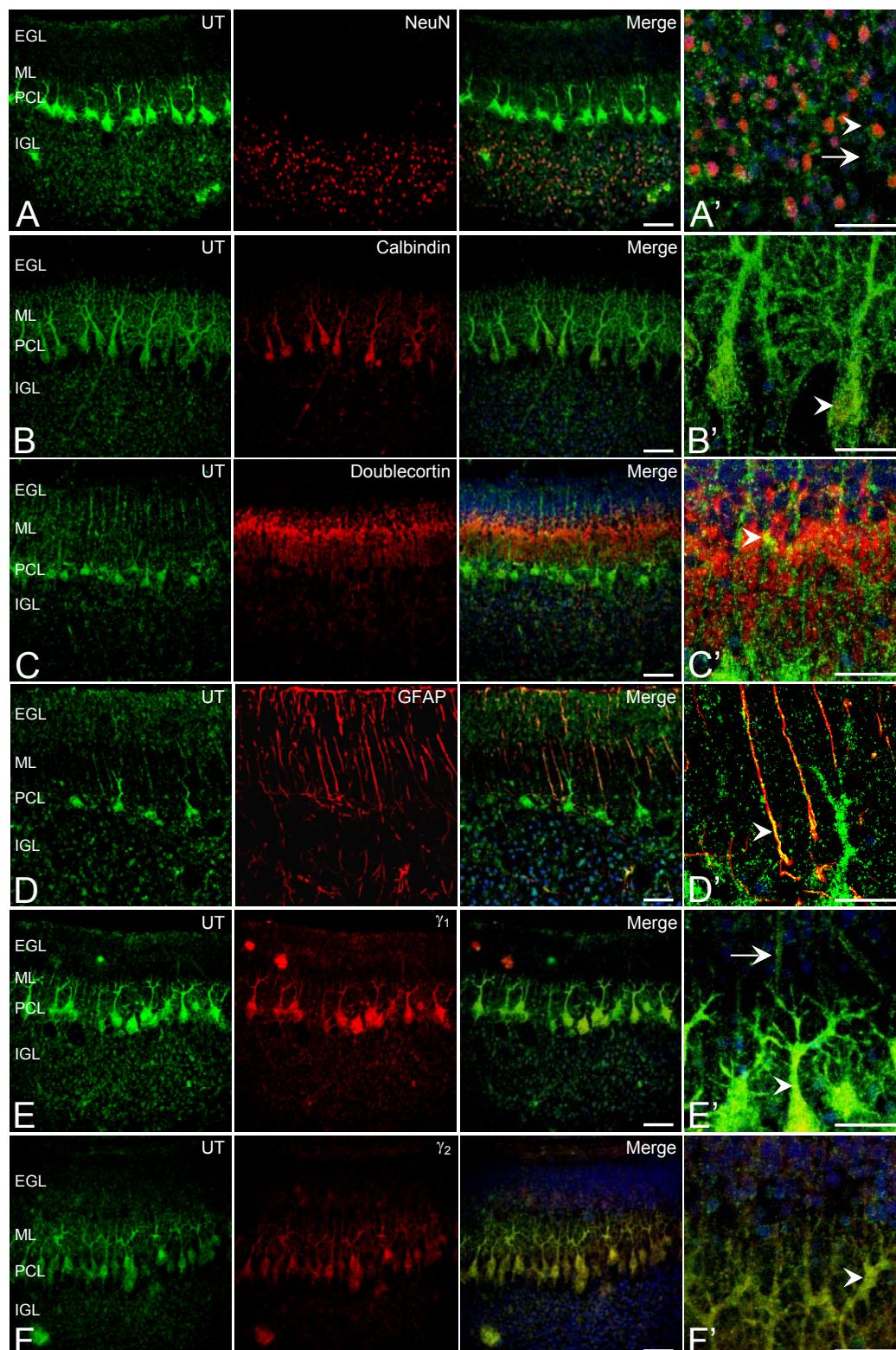


Figure 2
Lefebvre et al.

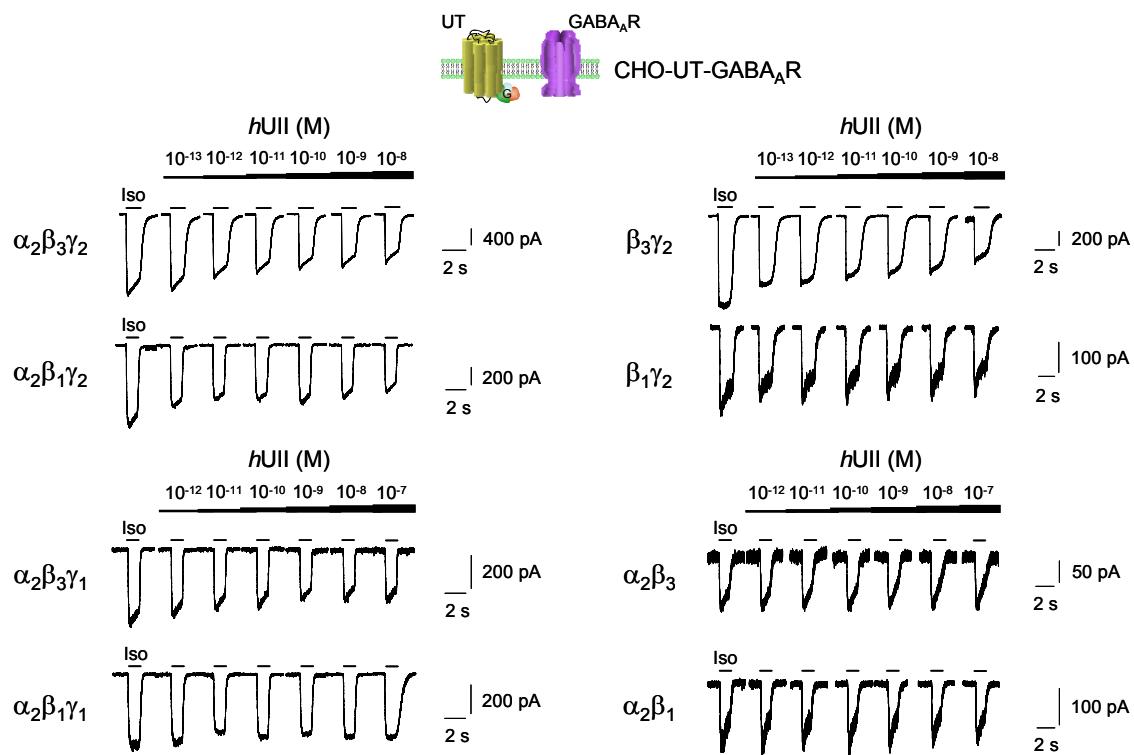
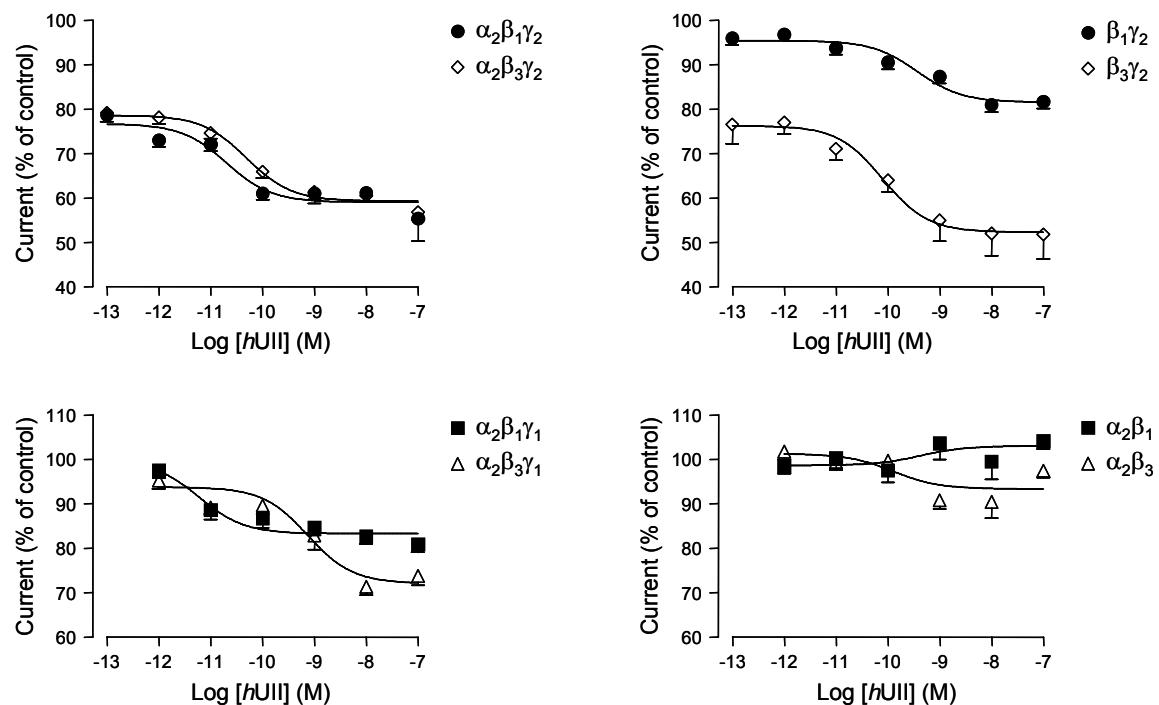
A**B**

Figure 3
Lefebvre et al.

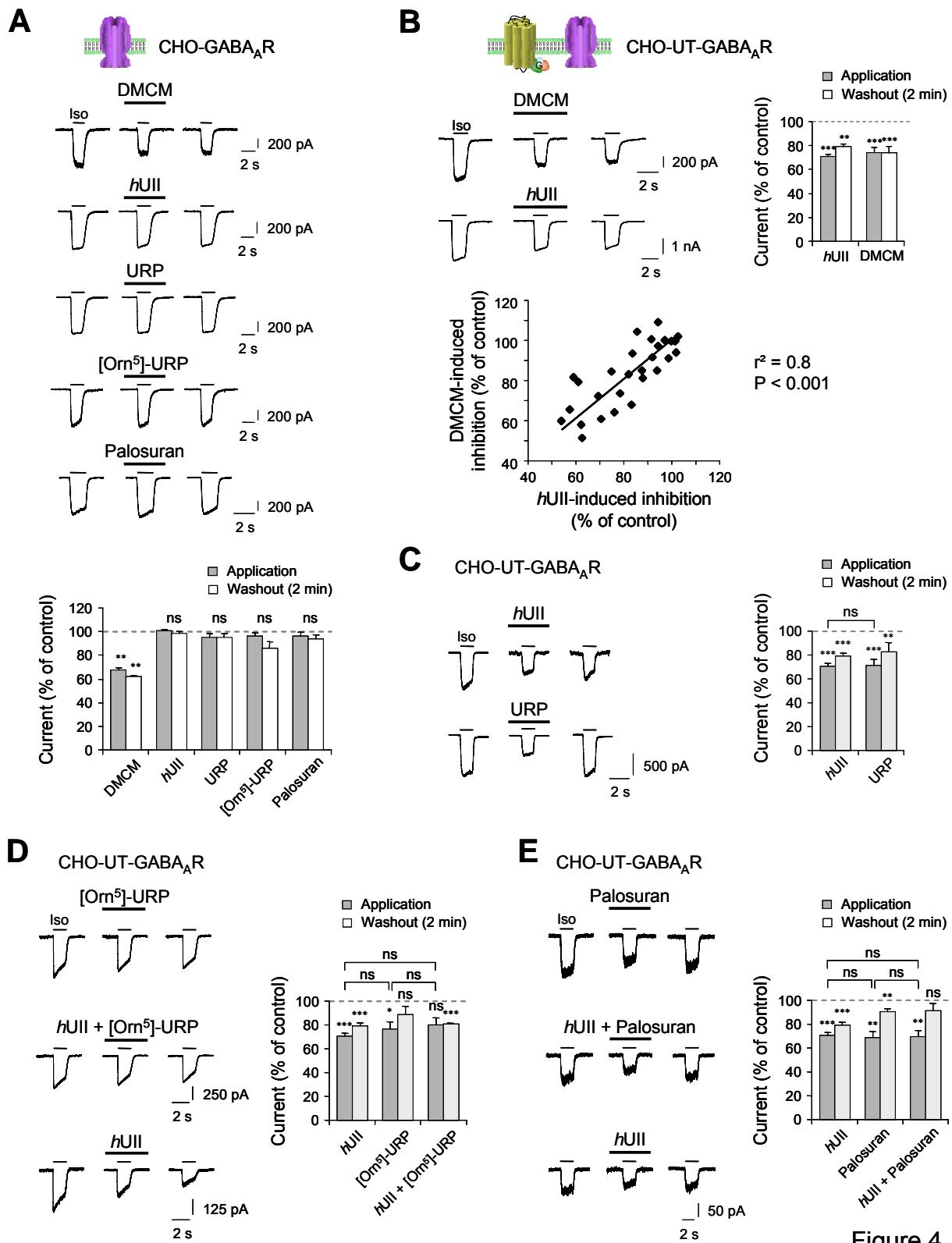


Figure 4
Lefebvre et al.

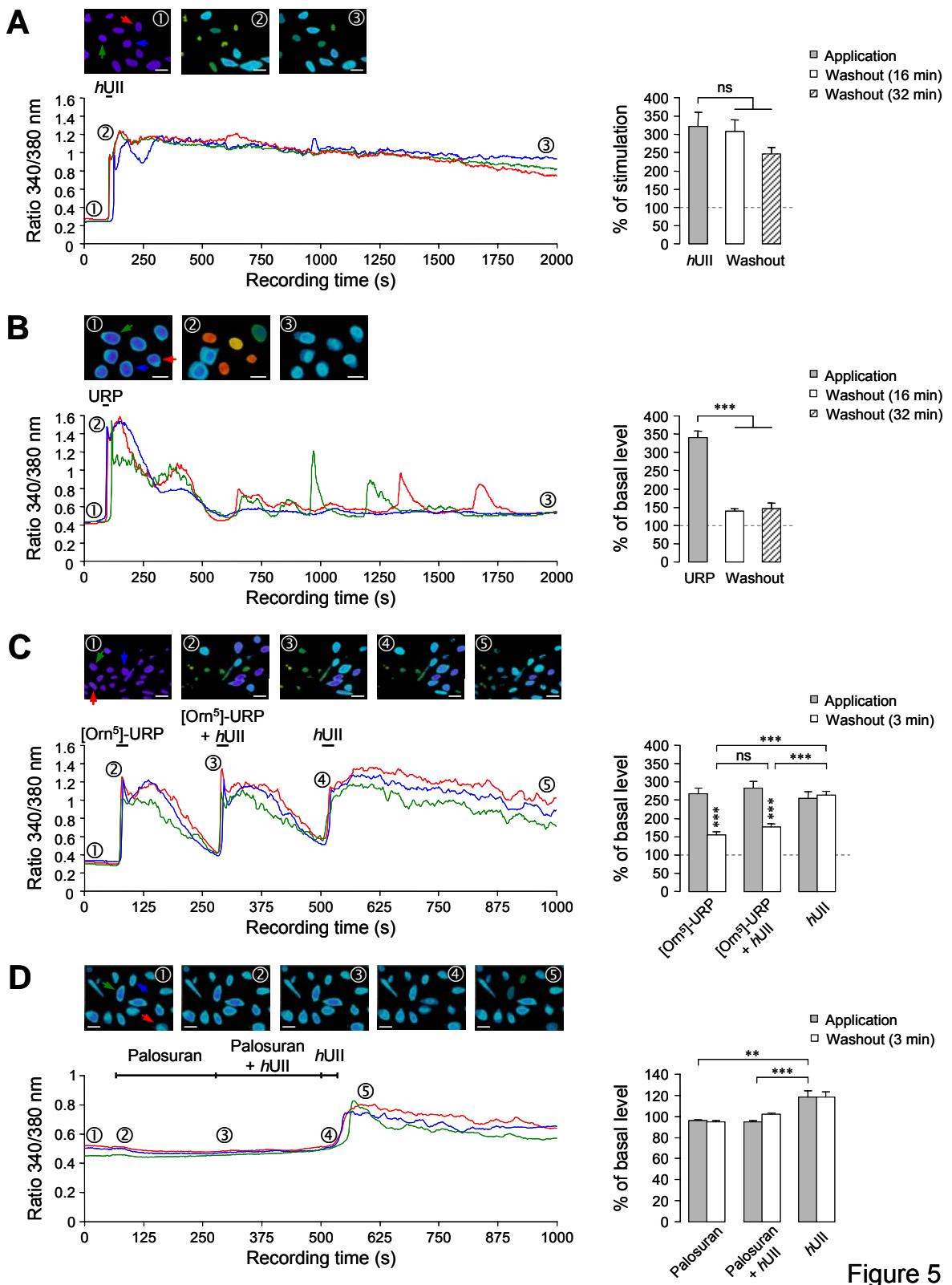


Figure 5
Lefebvre et al.

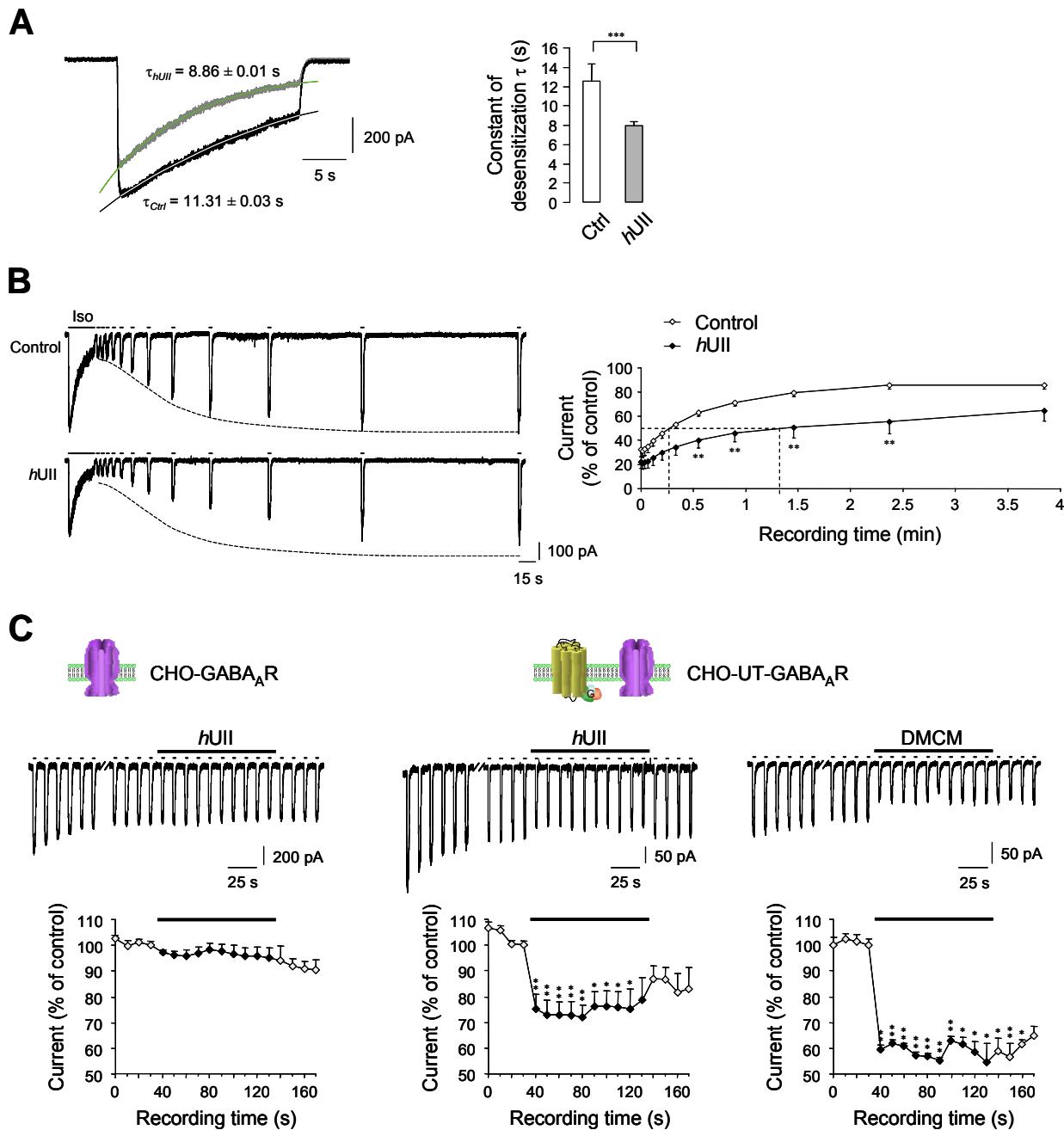


Figure 6
Lefebvre et al.

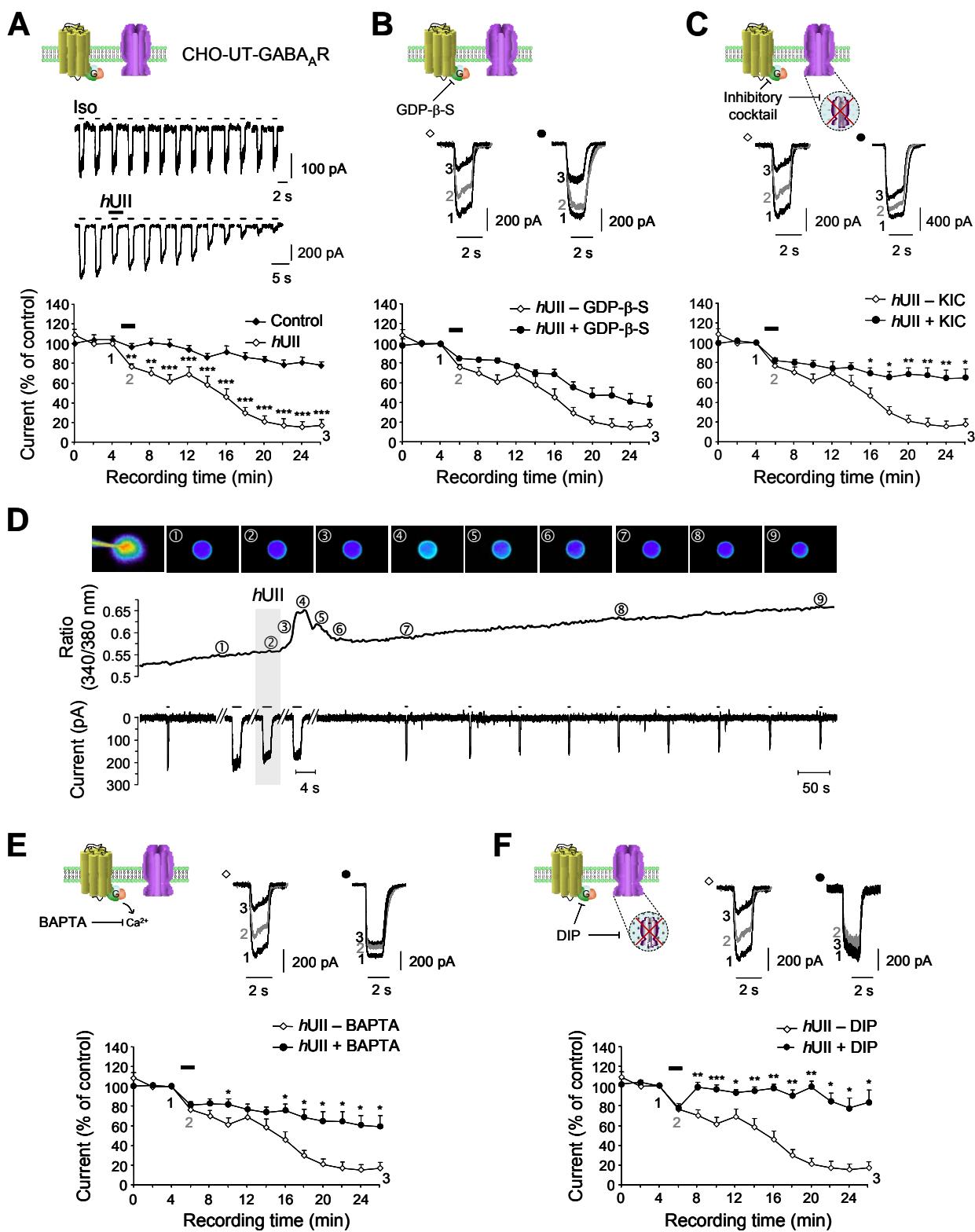
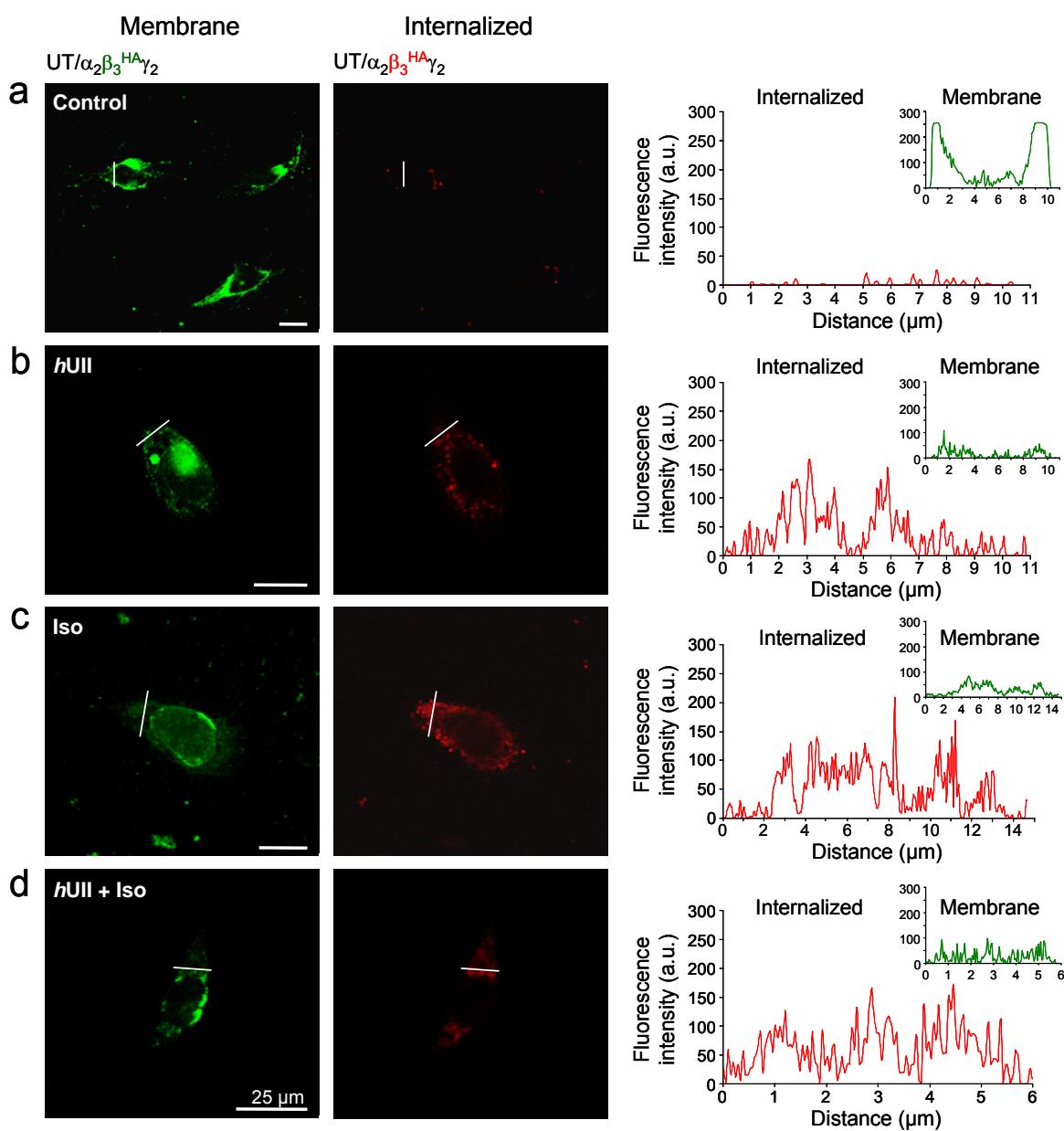


Figure 7
Lefebvre *et al.*

A



B

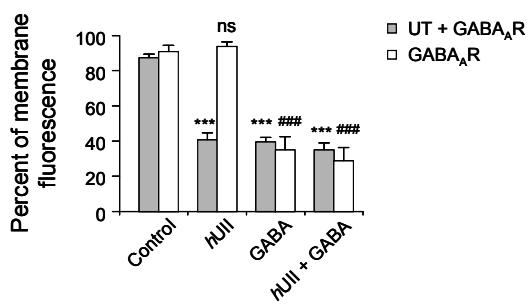


Figure 8
Lefebvre et al.

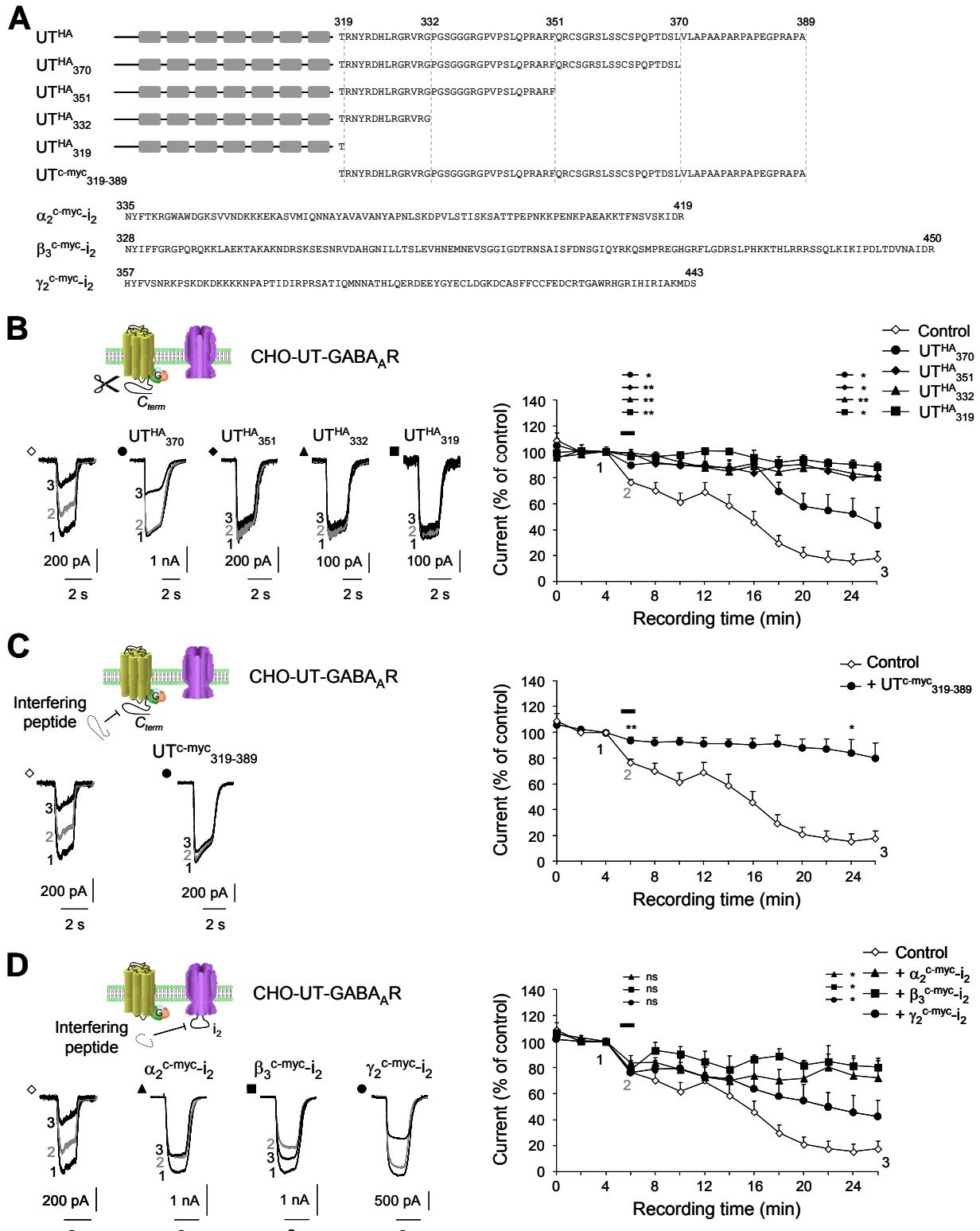


Figure 9
Lefebvre et al.

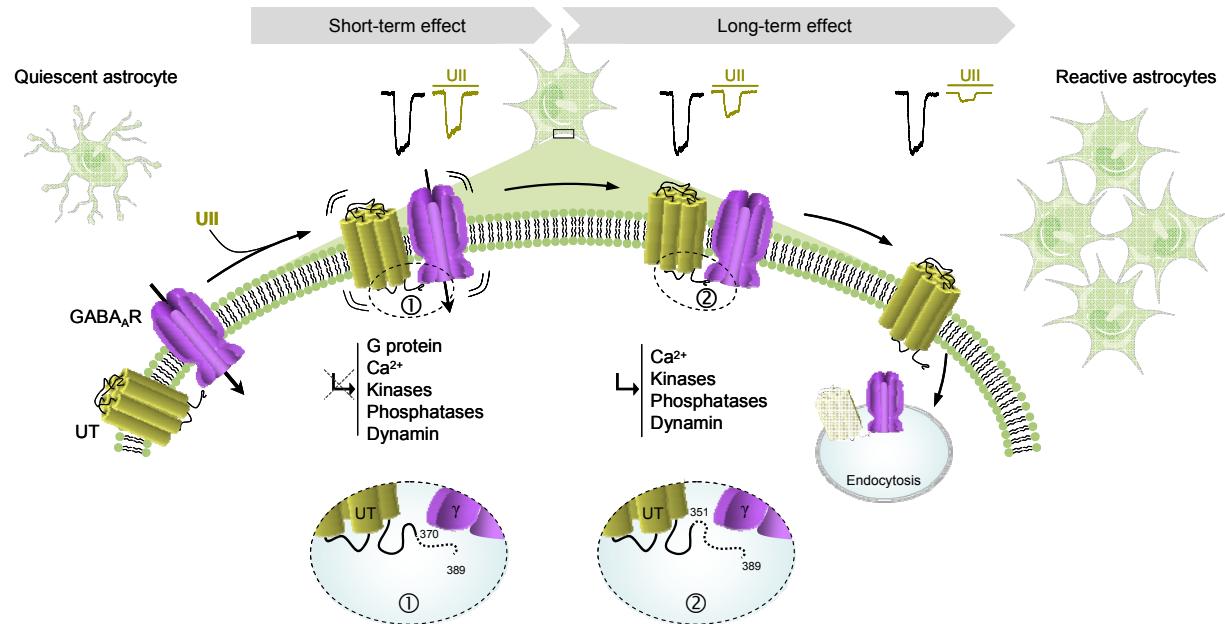


Figure 10
Lefebvre et al.

cDNA	Subcloning	Primers	Enzymes
α_2 (335-419) ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Forward: ATCGGAATTCTTATGAATTACTTCACCAAAAGAGGATGG Reverse: ATCGCTCGAGTTCATCTGTCAATTGCTAACACTGTTGAA	EcoRI/Xhol
β_3^{HA}	pCMV-HA	Forward: ATGCCTCGACCATGTGGGGCCTGCGGGAGGA Reverse: AAAGCGGCCGCTCAGTTAACATAGTACAGCCAGT	Sall/NotI
β_3 (328-450) ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Forward: ATCGGTCGACTATGAACTACATTTCTTGAAGAGGC Reverse: ATCGGCGGCCGCTCATCTGTCTATGGCATTACATCGGT	Sall/NotI
$\gamma_2^{\text{c-myc}}$	pCMV-c-myc	Forward: AAAGTCGACGATGAGTCGCCAATATATGGAG Reverse: AAACTCGAGTCACAGGTAGAGGTAGGAGAC	Sall/NotI
γ_2 (357-443) ^{c-myc}	pCMV-c-myc	Forward: ATCGGAATTCTTATGCATTATTTGTCAGCAACCGGAAA Reverse: ATCGCTCGAGTTCAAGGAGTCATTGGCAATGCGGAT	EcoRI/Xhol
UT ^{HA}	pCMV-HA	Forward: ATGCGAATT CGGATGGCGCTGACCCCCGAGT Reverse: AAACTCGAGTCACGCCGGGGCCCTGGG	EcoRI/Xhol
UT ^{HA} ₃₇₀	pCMV-HA	Forward: ATGCGAATT CGGATGGCGCTGACCCCCGAGT Reverse: GATCCTCGAGTCAGAGGCTGTCAGTGGCTGTGG	EcoRI/Xhol
UT ^{HA} ₃₅₁	pCMV-HA	Forward: ATGCGAATT CGGATGGCGCTGACCCCCGAGT Reverse: GATCCTCGAGTCAGAAGCGGGCGGGGGCTGC	EcoRI/Xhol
UT ^{HA} ₃₃₂	pCMV-HA	Forward: ATGCGAATT CGGATGGCGCTGACCCCCGAGT Reverse: GATCCTCGAGTCAGCCCCGACCGCGGCCGCG	EcoRI/Xhol
UT ^{HA} ₃₁₉	pCMV-HA	Forward: ATGCGAATT CGGATGGCGCTGACCCCCGAGT Reverse: GATCCTCGAGTTCAAGGTGAGCAGCGTAGAGGAAGGGGTTGGCGCA	EcoRI/Xhol
UT ^{c-myc} ₃₁₉₋₃₈₉	pCMV-c-myc	Forward: GATCGAATTCTTATGACCAGGAACCTACCGCGACCACCTG Reverse: GATCCTCGAGTTCAAGGTGAGCAGCGTAGAGGAAGGGGTTGGCGCA	EcoRI/Xhol

Table S1
Lefebvre *et al.*

Complexes	IC ₅₀ ± SEM	% Inhibition at 10 ⁻¹² M	% Inhibition at 10 ⁻⁷ M	r ²
$\alpha_2\beta_1\gamma_1$	6.03 ± 1.50 pM	2.54	19.16	0.68
$\alpha_2\beta_3\gamma_1$	741.00 ± 2.26 pM	4.77	26.25	0.83
$\alpha_2\beta_1\gamma_2$	20.40 ± 0.45 pM	27.01	44.62	0.68
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	49.00 ± 0.31 pM	21.90	43.21	0.78
$\alpha_2\beta_1$	ND	ND	ND	ND
$\alpha_2\beta_3$	ND	ND	ND	ND
$\beta_3\gamma_1$	366.00 ± 0.74 pM	3.13	18.29	0.84
$\beta_3\gamma_2$	79.40 ± 0.95 pM	23.00	48.16	0.65

Table S2
Lefebvre *et al.*

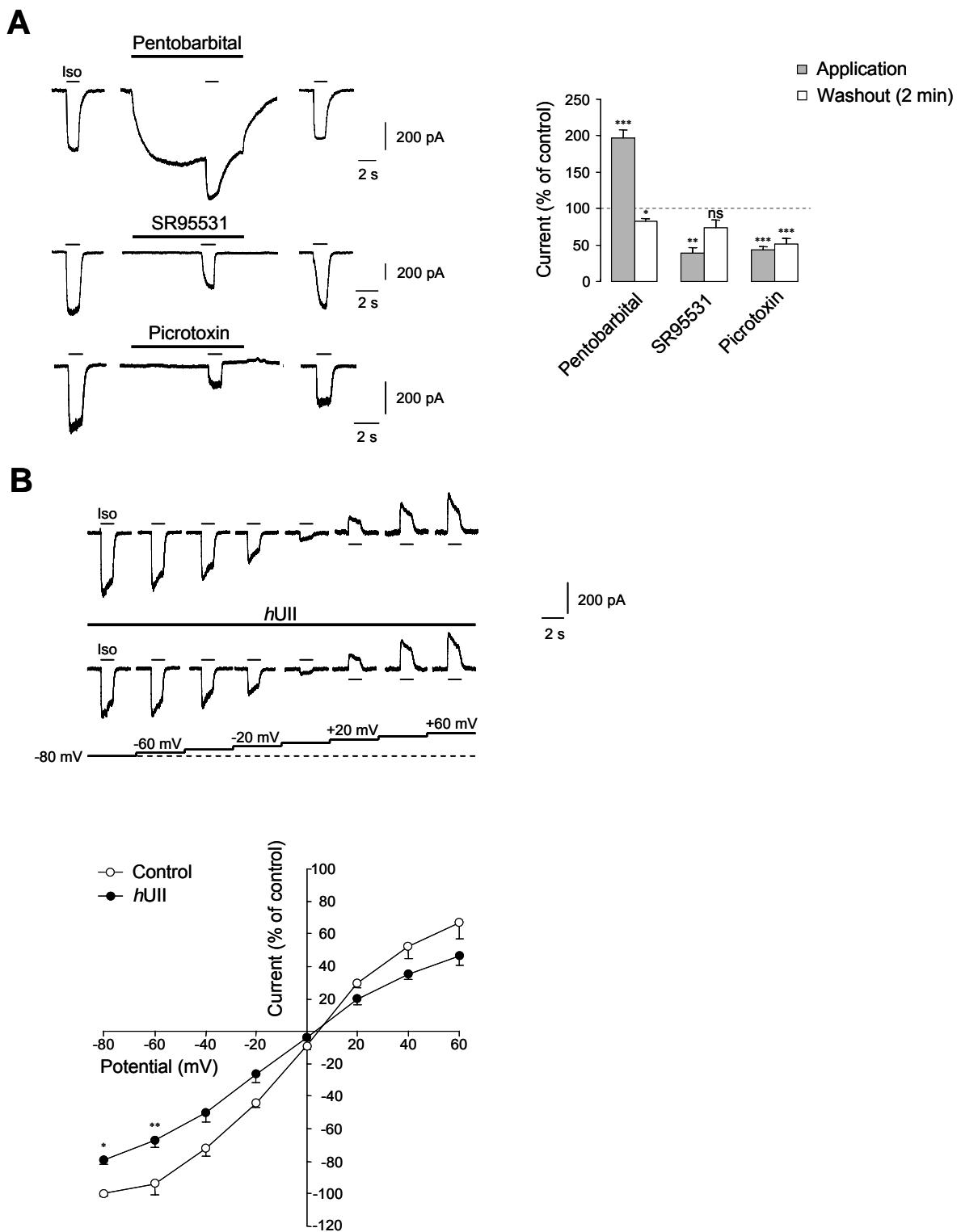


Figure S1
Lefebvre et al.

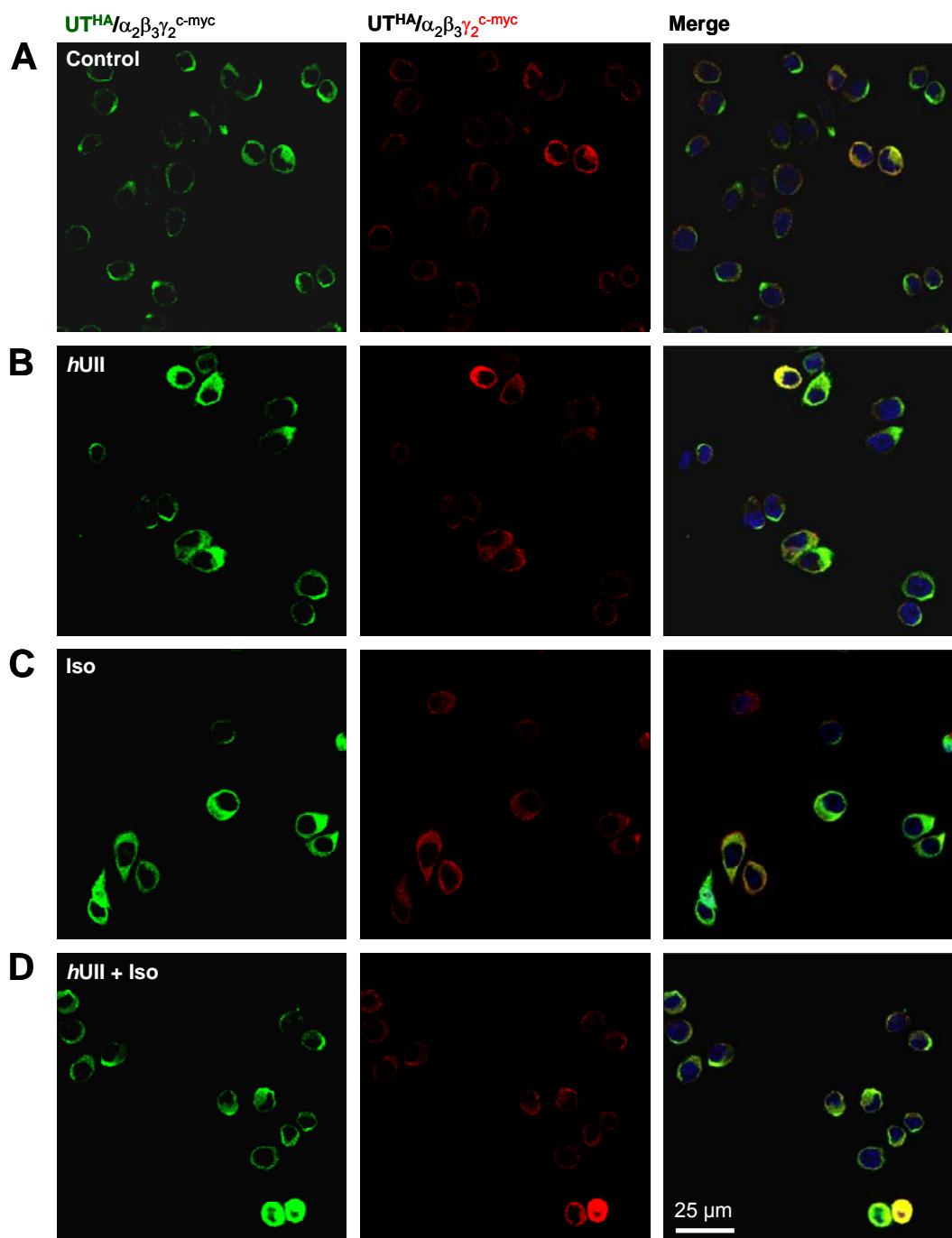
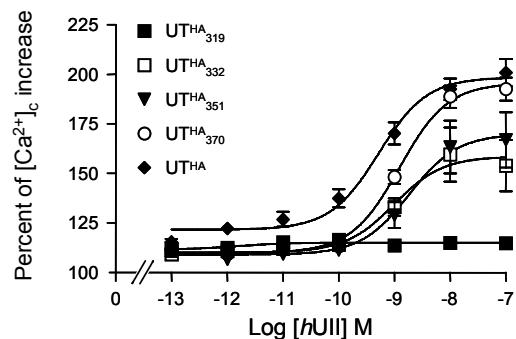


Figure S2
Lefebvre et al.

A**B**

Constructs	$IC_{50} \pm SEM$	Eff_{max} (% of control)	r^2
UT^{HA}	0.52 ± 1.09 nM	198.5	0.98
UT^{HA}_{370}	1.23 ± 1.05 nM	195.6	0.99
UT^{HA}_{351}	1.86 ± 1.08 nM	170.0	0.99
UT^{HA}_{332}	0.98 ± 1.15 nM	158.6	0.98
UT^{HA}_{319}	—	115.1	0.66

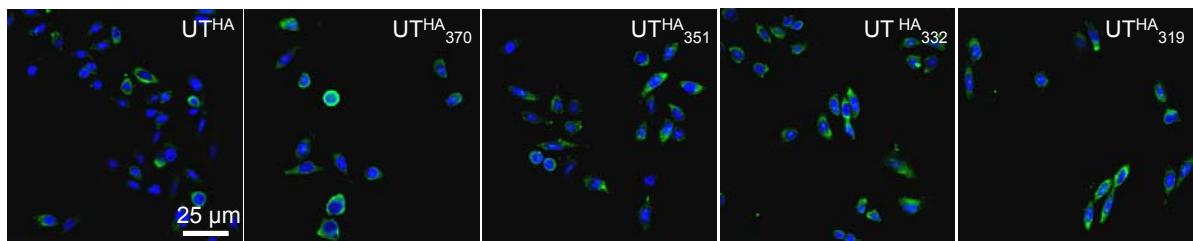
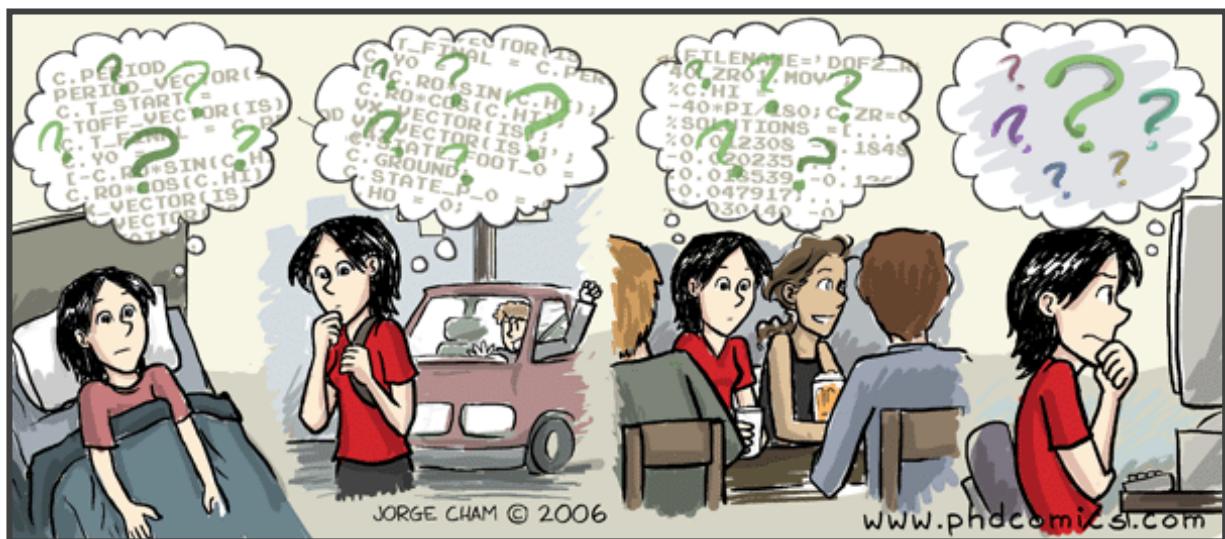
C

Figure S3
Lefebvre et al.

Discussion



Discussion

L'urotensine II (UII) et son paralogue l'*urotensin II-related peptide* (URP) sont deux neuropeptides cycliques considérés comme les facteurs endogènes vasoactifs les plus puissants caractérisés à ce jour. Les travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence la présence des ARNm codant l'UT et la protéine dans les astrocytes corticaux de Rat en culture, et ont montré que l'UII active les voies G_q-PLC-Ca²⁺, G_{i/o}, ou des canaux calciques de type T, et stimule la prolifération astrocytaire (Castel *et al.*, 2006 ; Jarry *et al.*, *in press*). Les différences d'affinité de l'UT pour l'UII et l'URP, et ses différents couplages pourraient s'expliquer par des phénomènes de plasticité dépendants de l'état de prolifération astrocytaire, eux-mêmes sous-tendus par des interactions physiques et/ou fonctionnelles avec d'autres récepteurs. Un exemple de plasticité "récepteur" a été suggéré pour le récepteur GABA_A, dont l'expression fonctionnelle à la membrane plasmique est inversement proportionnelle à la capacité de prolifération des astrocytes, après un accident vasculaire cérébral ou dans des tumeurs astrocytaires malignes (Labrakakis *et al.*, 1998 ; Tateishi *et al.*, 2006). Ces données suggèrent donc que le récepteur GABA_A est un récepteur "répresseur" de prolifération cellulaire. Une étude montrant que l'UII régule la fonction GABAergique dans les neurones d'Aplysie (Sawada et Ichinose, 1999), permettait d'envisager l'existence d'une interaction entre les effets mitogène de l'UII et répresseur du GABA sur la prolifération astrocytaire en conditions physiopathologiques. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de mieux comprendre le rôle de l'UT et du récepteur GABA_A dans les astrocytes en conditions physiologiques et physiopathologiques.

1. Caractérisation des voies de couplage de l'UT

L'ensemble des travaux menés à la fois sur des modèles *in vitro* (Liu *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Ziltener *et al.*, 2002 ; Castel *et al.*, 2006 ; Diallo *et al.*, 2008 ; Jarry

et al., in press) et *ex vivo* (Saetrum Opgraad *et al.*, 2000) a permis d'établir que l'UT est positivement couplé à la PLC *via* une protéine G_{q/11}. De fait, l'activation de l'UT par des concentrations croissantes d'UII ou d'URP entraîne une stimulation du métabolisme des PIPs associée à une augmentation de la [Ca²⁺]_c. Il a également été montré que l'UT est capable d'activer la voie de la PKA dans les neurones de la moelle épinière (Filipeanu *et al.*, 2002) et de réduire la formation d'AMPc induite par la forskoline dans des cellules transfectées par l'ADNc codant l'UT (Song *et al.*, 2006), suggérant un couplage de l'UT aux protéines G_s et G_{i/o}, respectivement.

Nous avons donc dans un premier temps étudié les voies de couplage de l'UT dans les astrocytes corticaux de Rat en culture. L'incubation des astrocytes avec des concentrations croissantes d'UII stimule de façon dose-dépendante la formation d'AMPc. La courbe concentration-réponse obtenue présente une distribution gaussienne, avec un effet maximal observé pour des concentrations picomolaires. L'augmentation de la production d'AMPc induite par l'UII est bloquée par l'antagoniste sélectif de l'AC, le SQ 22536, confirmant ainsi l'existence d'un couplage positif entre l'UT et l'AC. Cependant, pour des concentrations supérieures à 10 nM, l'effet inhibiteur de l'UII sur l'activité adenylyl cyclasique est atténué. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ce phénomène pouvait être lié à un changement de couplage de l'UT, de la protéine G_s à la protéine G_i, dépendant de la PKA. En effet, nous montrons que le H89, un inhibiteur de PKA, prévient la diminution de l'efficacité de l'UII à stimuler la formation d'AMPc observée en réponse à de fortes concentrations d'UII. Cette hypothèse de l'existence d'un couplage à la protéine G_i est en accord avec le travail de Song *et al.* (2006) qui démontre que l'UII est également capable d'inhiber la production d'AMPc induite par la forskoline. Un tel mécanisme de double couplage aux protéines G_s et G_i a déjà été mis en évidence dans les myocytes cardiaques pour d'autres RCPG tels que les récepteurs β₂ adrénnergiques (Kilts *et al.*, 2000 ; Xiao, 2001). Dans notre étude, nous proposons que l'activation de la PKA consécutive au couplage UT/G_s/AC en réponse à l'UII pourrait conduire à une boucle de régulation et à la phosphorylation de l'UT au niveau de sites consensus de phosphorylation. En effet, Lawler *et al.* (2001) ont démontré que la

phosphorylation par la PKA du résidu Ser³⁵⁷ du récepteur de la prostacycline couplé à la protéine G_s, favorise son couplage à une protéine G_i, conduisant donc à une inhibition de l'AC. Ainsi, considérant que l'UT de Rat présente dans sa région cytosolique C_{term} de nombreux résidus sérine et thréonine regroupés sous forme de *clusters* (Proulx *et al.*, 2005), ils pourraient constituer des sites potentiels de phosphorylation par une PKA, impliqués dans le changement de couplage observé dans les astrocytes.

Il existe de plus en plus de preuves montrant qu'un RCPG peut simultanément activer l'AC et la PLC. Par exemple, les récepteurs muscarinique M₄, somatostatnergiques et opioïdériques, négativement couplés à l'AC, sont également positivement couplés à la PLC (Murthy *et al.*, 1996a, b). Nos résultats révèlent que l'UT, exprimé dans les astrocytes, est couplé aux voies AC/PKA et PLC/PKC. La courbe concentration-réponse de l'effet de l'UII sur le métabolisme des PIPs présente un profil biphasique, dont l'analyse permet d'extraire une affinité de l'ordre de 30 nM pour la deuxième phase. Il faut noter qu'aux concentrations d'UII impliquées dans ce rebond, l'activation de l'AC est probablement diminuée. De plus, nous montrons que le H89 réduit fortement l'effet stimulant de l'UII sur le métabolisme des PIPs. Ainsi, la capacité de l'UII à augmenter l'activité de la PLC peut s'expliquer, au moins en partie, par le changement de couplage de l'UT, d'une protéine G_s vers une protéine G_i. L'activation de l'UT par de fortes concentrations d'UII conduirait à l'augmentation de l'activité de la PLC *via* un mécanisme impliquant la phosphorylation de l'UT par la PKA. A l'appui de cette hypothèse, il a récemment été montré que la délétion des 50 derniers résidus de l'UT de Rat, parmi lesquels se trouvent de nombreux sites de phosphorylation, diminue la capacité de l'UII à induire la formation d'IP₃ (Proulx *et al.*, 2005). Ainsi, nos résultats montrent que, dans les astrocytes de Rat en culture, la liaison de l'UII entraîne un couplage de l'UT aux voies G_q/PLC/PKC et G_s/AC/PKA. L'activation de la PKA provoque un changement de couplage de l'UT, d'une protéine G_s à une G_i, et une meilleure affinité pour la protéine G_q (Figure 21).

2. L'activation du récepteur GABA_A inhibe le coulage de l'UT aux protéines G_s/G_q

Il est désormais clairement établi que l'oligomérisation des RCPG affecte certaines fonctions des récepteurs telles que la liaison du ligand ou son couplage aux protéines G (Bai, 2004). Les premières études de caractérisation de l'UT dans les astrocytes menées dans notre équipe ont révélé la présence de 2 sites de liaison pour l'UII (Castel *et al.*, 2006). Des résultats similaires avaient auparavant été obtenus sur des cellules CHO transfectées avec l'ADNc codant l'UT (Clozel *et al.*, 2004). Dans la mesure où la présence du récepteur sous forme couplée ou découplée à une protéine G avait été écartée (Castel *et al.*, 2006), l'existence de dimères d'UT ou son association avec un autre récepteur constituait une hypothèse séduisante pour expliquer l'existence de ces 2 sites de très haute et haute affinités. Nous montrons que, dans les astrocytes de Rat en culture, le GABA et l'agoniste spécifique du récepteur GABA_A, l'isoguvacine, réduisent l'effet stimulant de l'UII sur la formation d'AMPc (Figure 21). La courbe concentration-réponse de l'UII sur la formation d'AMPc

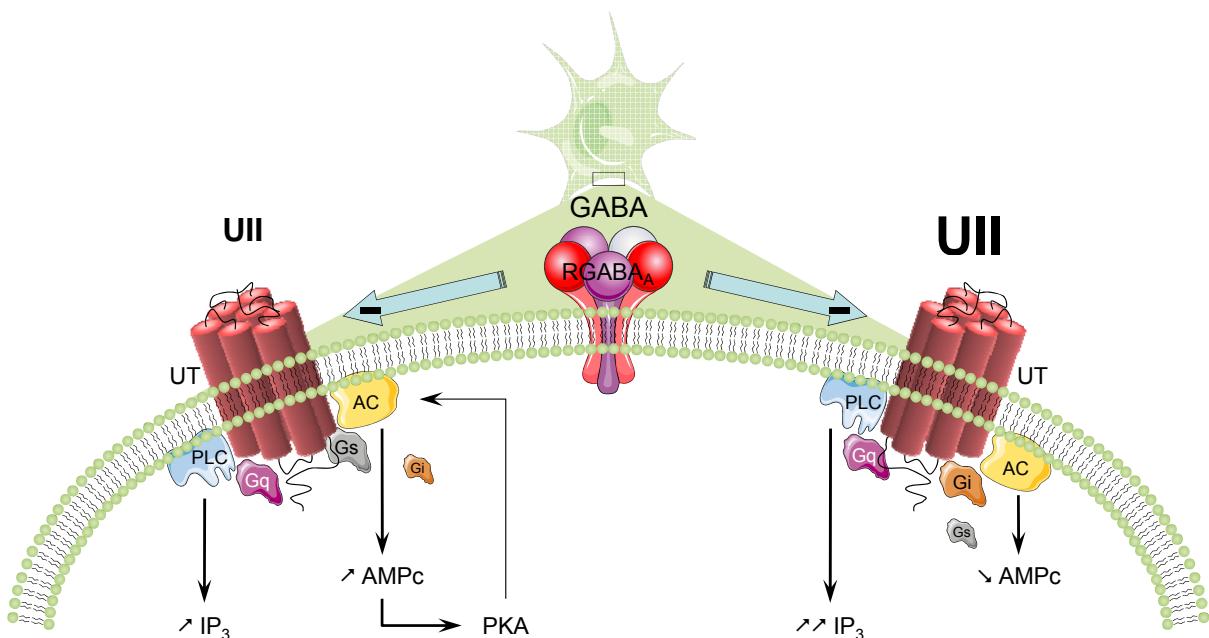


Figure 21 : Représentation schématique des différentes voies de couplage de l'UT modulées par l'activation du récepteur GABA_A. De faibles concentrations d'UII stimulent à la fois les voies G_s/AC/AMPc/PKA et G_q/PLC/PIP_s. L'activation de la PKA entraîne une baisse d'affinité de l'UT pour les protéines G_s et une augmentation de l'affinité pour les protéines G_i. A plus fortes concentrations, l'UII conserve sa capacité à stimuler le métabolisme des PIP_s mais inhibe la formation d'AMPc. L'activation du récepteur GABA_A atténue les effets de l'UII à la fois sur la formation d'AMPc et le métabolisme des PIP_s. RGABA_A, récepteur GABA_A.

réalisée en présence d’isoguvacine montre que l’activation du récepteur GABA_A réduit fortement l’affinité et l’efficacité du couplage de l’UT à l’AC. En plus de l’UT, les cellules astrocytaires expriment également certains variants des récepteurs de la somatostatine, incluant sst1, sst2 et sst4 (Feindt *et al.*, 1995 ; Masmoudi *et al.*, 2005) qui présentent de fortes homologies de séquence avec l’UT (Marchese *et al.*, 1995). Des études récentes montrent que l’UII et URP sont capables d’activer les récepteurs de type 2 et 5 (Malagon *et al.*, 2008). Toutefois, nos résultats montrent que l’isoguvacine ne modifie pas la capacité de la somatostatine à inhiber la formation d’AMPc induite par la forskoline dans les astrocytes de Rat, démontrant ainsi que l’activation spécifique du récepteur GABA_A module le couplage de l’UT à l’AC. De plus, le GABA et l’isoguvacine inhibent l’augmentation du métabolisme des PIPs induite par l’UII (Figure 21). L’effet maximum est observé pour des concentrations d’UII de l’ordre du pM, pour lesquelles l’UII stimule la formation d’AMPc. Ainsi, le récepteur GABA_A régule spécifiquement la fonction de l’UT *via* les voies G_q/G_s. De fait, en diminuant l’activité de l’AC par la protéine G_s et consécutivement, celle de la PKA, le GABA pourrait inhiber le changement de couplage de la protéine G_s vers la protéine G_i, et ainsi bloquer la deuxième phase de stimulation du métabolisme des PIPs observée pour de plus fortes concentrations d’UII (Figure 21). Ces résultats démontrent pour la première fois que la fonction du récepteur UT peut être régulée par un récepteur canal, et suggèrent que le couplage de l’UT aux protéines G est régulé soit par une association directe avec le récepteur GABA_A, soit par un mécanisme impliquant l’efflux d’ions chlore à l’origine d’une entrée de calcium *via* les canaux calciques voltage-dépendant. En effet, il a été montré sur des cultures d’astrocytes hippocampaux que l’activation du récepteur GABA_A entraîne l’ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (Fraser *et al.*, 1995) et que l’entrée de calcium peut inhiber l’activité des AC de type V et VI et la formation d’AMPc (Cooper *et al.*, 1995 ; Cooper, 2003).

3. Caractérisation de l'expression de l'UT et du récepteur GABA_A

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des interactions fonctionnelles entre le système urotensinergique et le système GABAergique, nous avons dans un premier temps rechercher les niveaux d'expression de l'UT et du récepteur GABA_A sur un modèle de tranches et sur des co-cultures astrocytes/neurones de cervelet de rats âgés de 7 jours, stade auquel les précurseurs neuronaux de la couche granulaire externe migrent le long des fibres de Bergman et se différencient dans la couche granulaire interne. Les travaux de Lin *et al.* (2003b) ont montré que l'UT est majoritairement exprimé par une sous-population d'astrocytes du tronc cérébral et de l'hypothalamus, et des études menées dans notre équipe ont mis en évidence une expression fonctionnelle de l'UT dans les astrocytes corticaux en culture (Castel *et al.*, 2006).

Nos études de co-marquage réalisées sur les tranches de cervelet montrent que l'UT est fortement exprimé dans les neurones de Purkinje, ainsi que dans des fibres astrocytaires de la couche moléculaire, correspondant aux cellules de la glie de Bergmann. L'UT est également présent dans des fibres de la couche moléculaire, étroitement juxtaposées à des structures cellulaires immunopositives pour la doublecortine, un marqueur spécifique des neurones immatures précurseurs proliférants. Cette localisation suggère que l'UT astrocytaire pourrait être impliqué dans le processus de migration radiale des neurones en grain. Sur les co-cultures astrocytes/neurones de cervelet, l'UT est principalement exprimé dans les astrocytes et colocalise très fortement avec la GFAP. Nos montrons également, dans les tranches et les co-cultures, que certains neurones en grain matures présentent un marquage diffus pour l'UT, comme observé dans les cellules révélées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le NeuN (*Neuronal Nuclei*). Des études antérieures avaient déjà établi la présence de sites de liaison de l'UUI et d'ARNm codant l'UT dans le cervelet, notamment dans les cellules de Purkinje et la couche granulaire interne (Clark *et al.*, 2001 ; Gartlon *et al.*, 2001 ; Jégou *et al.*, 2006). De plus, dans les neurones de Purkinje ainsi que dans les fibres de Bergman, l'UT est co-localisé principalement avec les sous-unités γ_1 , et dans une moindre mesure γ_2 , du récepteur GABA_A. Une telle expression des sous-unités γ_1 et γ_2 du complexe GABA_A dans le cervelet a été

précédemment démontrée par immunocytochimie (Müller *et al.*, 1994 ; Khan *et al.*, 1996 ; Miralles *et al.*, 1999 ; Pirker *et al.*, 2000), hybridation *in situ* (Wisden *et al.*, 1989 ; Laurie *et al.*, 1992a ; Persohn *et al.*, 1992), microscopie électronique (Riquelme *et al.*, 2002) et PCR-quantitative (Bovolin *et al.*, 1992), révélant en effet une expression majoritaire des isoformes α_5 , γ_1 et γ_3 dans les cellules de Purkinje, et de γ_1 dans la glie de Bergman, au stade immature.

4. L'activation de l'UT inhibe la fonction du récepteur GABA_A dans les astrocytes

Même si la réponse des astrocytes au GABA a été bien caractérisée (dépolarisation cellulaire), Hösli *et al.* (1997) les études montrent que l'amplitude du courant Cl⁻ induit par le GABA dans les astrocytes *in vitro* diminue avec l'âge de la culture. Ce mécanisme, encore mal compris, pourrait s'expliquer par la prolifération majoritaire d'astrocytes exprimant peu, voire pas, le récepteur GABA_A, et/ou par une perte de la fonctionnalité du récepteur corrélée à la prolifération (Hösli *et al.*, 1997). Il a été démontré que lorsque les astrocytes sont cultivés en présence de neurones, leur prolifération est inhibée et la réponse au GABA maintenue (Gasser and Hatten, 1990), suggérant que des interactions neurones/astrocytes modulent la prolifération et la différenciation des cellules gliales. Nous avons donc recherché l'existence d'une interaction entre l'UT et le récepteur GABA_A exprimés dans les astrocytes cultivés en présence de neurones. Nos travaux, réalisés en conservant des concentrations intracellulaires physiologiques de Cl⁻, indiquent que 12% des astrocytes cultivés seuls contre 48% des astrocytes cultivés en présence de neurones répondent à l'agoniste du récepteur GABA_A, l'isoguvacine, par un courant chlore et une dépolarisation membranaire. De plus, nous montrons que l'augmentation du niveau d'expression du récepteur GABA_A observée dans les co-cultures s'accompagne de changements de la morphologie des astrocytes et d'un décalage de leur potentiel de repos vers des valeurs plus hyperpolarisées. En effet, les astrocytes cultivés seuls, majoritairement plats et polygonaux, prolifèrent jusqu'à former un tapis cellulaire confluent à 6 jours, tandis que les astrocytes cultivés en présence de neurones, ramifiés, prolifèrent moins vite et s'organisent au contact des groupes de neurones (Figure 22). En accord avec ces résultats, McKhann *et al.* (1997) ont démontré que les

astrocytes proliférants présentent des valeurs de potentiel de repos plus dépolarisées. Ils démontrent de manière élégante que les variabilités observées parmi les études publiées dépendent des communications intercellulaires au moment de l'enregistrement électrophysiologique d'une cellule unique ; les valeurs de potentiel plus dépolarisées étant corrélées à des astrocytes proliférants et donc connectés.

Dans ce modèle de co-culture, nous montrons par la technique de patch-clamp que la perfusion d'UII de Rat au voisinage des cellules inhibe la dépolarisation membranaire et atténue de manière concentration-dépendante l'amplitude du courant chlore évoquée par l'isoguvacine uniquement dans les astrocytes. L'effet de l'UII sur l'inhibition de la fonction du récepteur GABA_A, caractérisé par un ralentissement de la cinétique d'activation ainsi qu'une accélération de la désensibilisation du courant chlore, est très puissant et persiste pendant le rinçage. L'absence d'effet de l'UII dans les neurones pourrait s'expliquer par une composition différente en sous-unités du récepteur GABA_A dans les astrocytes et les

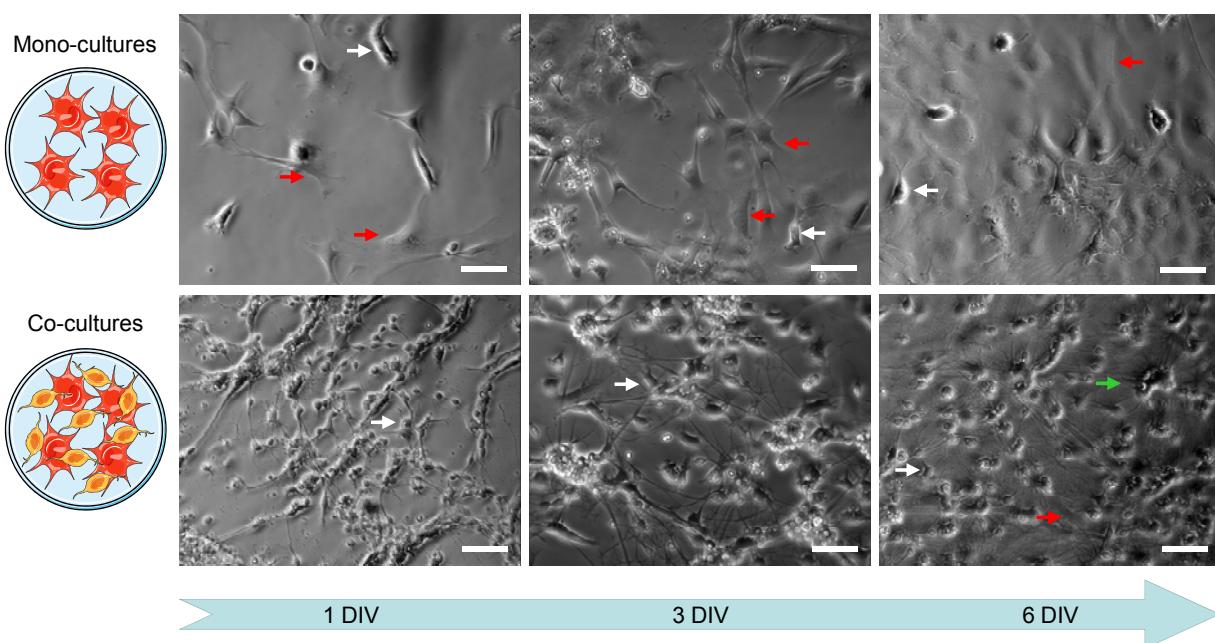


Figure 22 : Microphotographies illustrant la proportion, la distribution et la morphologie des astrocytes et/ou des neurones en mono- et co-cultures astrocyte/neurone. Les cultures présentent deux types astrocytaires morphologiquement distincts, *i.e.* des astrocytes plats et polygonaux (*flèches rouges*) et des astrocytes dont le corps cellulaire de petite taille se ramifie (*flèches blanches*). Les astrocytes cultivés seuls (*haut*), majoritairement plats, prolifèrent et forment un tapis confluent à 6 jours de culture (DIV), tandis que la présence de neurones (*bas*) entraîne une diminution de la prolifération et une réorganisation des astrocytes ramifiés au contact des groupes de neurones (*flèche verte*). Echelle, 50 µm.

neurones. En effet, les neurones en grain du cervelet expriment majoritairement les isoformes α_1 , α_6 , β_2 , β_3 et δ (Laurie *et al.*, 1992 ; Pirker *et al.*, 2000), suggérant que les complexes GABA_A formés par ces sous-unités ne constituent pas une cible potentielle de l'UT. Ainsi, nos résultats démontrant l'inhibition du couplage de l'UT par l'activation du récepteur GABA_A dans les astrocytes corticaux, associés aux récents travaux de Kawaguchi *et al.* (2009) qui indiquent que les benzodiazépines inhibent la libération de noradrénaline induite par l'UII, et nos études révélant que l'UII diminue réciproquement l'activité GABAergique dans les astrocytes de cervelet, suggèrent l'existence d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre l'UT et le récepteur GABA_A dans les astrocytes.

5. Caractérisation des mécanismes impliqués dans l'interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre l'UT et le récepteur GABA_A dans une lignée CHO

Afin de rechercher la nature de la ou des sous-unité(s) du récepteur GABA_A impliquée(s) dans les effets de l'UII, différentes combinaisons en ADNc codant diverses sous-unités du récepteur GABA_A humain ont été transfectées transitoirement dans des lignées CHO natives ou des lignées CHO exprimant de manière stable l'UT humain (CHO-UT). Même si la fonctionnalité de complexes GABA_A composés d'un seul isoforme fait encore débat, l'expression d'une seule (Blair *et al.*, 1988 ; Pritchett *et al.*, 1988) ou de deux sous-unités, $\alpha_1\gamma_2$ ou $\beta_2\gamma_2$, est capable de reformer un pentamère perméable aux ions chlore en réponse au GABA (Sigel *et al.*, 1990 ; Krishek *et al.*, 1994 ; Angelotti and Macdonald, 1993). Nous montrons que l'UII inhibe fortement l'amplitude du courant évoqué par l'isoguvacine sur les complexes $\beta_3\gamma_2 \approx \alpha_2\beta_{3/1}\gamma_2$ et plus faiblement sur $\alpha_2\beta_{1/3}\gamma_1$, et qu'il est sans effet lorsque la sous-unité γ n'est pas associée au complexe GABA_A. La composition en sous-unités influence fortement l'affinité du récepteur pour le GABA, son profil pharmacologique (Sieghart *et al.*, 1995 ; Hevers and Luddens, 1998 ; Boileau *et al.*, 2002) ainsi que les propriétés intrinsèques du canal chlore, *i.e.* les constantes de désensibilisation et de déactivation (Bianchi *et al.*, 2001 ; Boileau *et al.*, 2003 ; Feng *et al.*, 2004). Nous avons donc vérifié sur un complexe $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ que la co-expression de l'UT dans la lignée CHO ne modifiait pas les caractéristiques

pharmacologiques du récepteur GABA_A. Nous montrons que l'antagoniste compétitif SR95531 inhibe, et que le pentobarbital stimule le courant chlore, conformément aux précédentes études réalisées sur des modèles recombinants (Hamann *et al.*, 1988 ; Rupprecht and Holsboer, 1999 ; Krampf *et al.*, 2002 ; Lindquist *et al.*, 2005 ; Macdonald and Olsen, 1994). De plus, la présence systématique de la sous-unité γ au sein du complexe a été contrôlée en testant le modulateur allostérique du récepteur GABA_A, le DMCM. Classiquement, le DMCM inhibe l'activité de récepteurs comprenant une sous-unité γ_2 (Bormann *et al.*, 1985 ; Puia *et al.*, 1991 ; Wafford *et al.*, 1993), stimule la fonction de ceux comportant l'isoforme γ_1 (Bormann and Kettenmann, 1988 ; Bovolin *et al.*, 1992), et est sans effet lorsque la sous-unité γ est absente (Bormann *et al.*, 1985 ; Herb *et al.*, 1992). Dans la grande majorité des cellules testées, le DMCM inhibe le courant GABA_A, confirmant ainsi la présence de la sous-unité γ_2 au sein des complexes exprimés dans les cellules CHO. Au cours de notre étude, nous avons constaté qu'une brève application d'UII accélère la cinétique de désensibilisation du courant chlore, et augmente le temps nécessaire pour permettre à l'ensemble des complexes GABA_{AR} de revenir dans leur état « activable ». Cet effet peut être comparé à l'état de désensibilisation du récepteur exposé à de très fortes concentrations de GABA, et suggère donc que l'UII entraîne un changement conformationnel du complexe récepteur lorsqu'il est lié au GABA. Par un protocole d'éjections consécutives d'un agoniste, nous montrons que l'UII, perfusée pendant seulement 2 s, est déjà capable d'entraîner une diminution du courant chlore uniquement lorsque l'UT est co-exprimé, un effet qui est mimé par le DMCM.

Nous avons ensuite testé la capacité des ligands urotensinergiques, agonistes et antagonistes, à moduler l'activité du récepteur GABA_A sur des CHO exprimant l'UT et/ou les sous-unités $\alpha_2\beta_3\gamma_2$. Dans les cellules exprimant uniquement le récepteur GABA_A, l'UII et l'URP, dont la partie cyclique biologiquement active est commune, l'antagoniste peptidique [Orn⁵]-URP et l'antagoniste non-peptidique palosuran, ne modulent pas le courant GABA_A. Lorsque l'UT est co-exprimé avec le récepteur GABA_A, l'UII et l'URP inhibent irréversiblement et réversiblement le courant chlore, respectivement. Des effets similaires ont

été obtenus sur des tests de mobilisation calcique : l'UII entraîne une augmentation irréversible de la $[Ca^{2+}]_c$ alors que l'URP stimule transitoirement la $[Ca^{2+}]_c$ dans les CHO-UT. L'effet prolongé observé avec l'UII pourrait s'expliquer par la dissociation lente du peptide de son récepteur UT, un phénomène précédemment décrit sur des récepteurs de Rat et humain, natifs et recombinants (Clozel *et al.*, 2004 ; Douglas *et al.*, 2004b ; Qi *et al.*, 2004 ; Castel *et al.*, 2006). Ainsi, une faible dissociation permet d'expliquer les effets prolongés de l'UII observés dans les expériences de contraction d'anneaux d'aortes (Labarrère *et al.*, 2003), de test de mobilisation calcique (Jarry *et al.*, *in press*) ainsi que sur l'inhibition du courant chlore. De façon moins attendue, les deux antagonistes testés inhibent la fonction GABAergique, mimant ainsi les effets de l'UII. Leurs actions sont réversibles et suggèrent que l' $[Orn^5]$ -URP et le palosuran se comportent comme des "agonistes" de l'UT sur la modulation de l'activité du récepteur GABA_A. De manière plus surprenante encore, nous montrons que l' $[Orn^5]$ -URP se comporte comme un agoniste partiel et comme un antagoniste compétitif sur la $[Ca^{2+}]_c$, alors que le palosuran, qui ne présente pas d'activité propre, abolit totalement l'effet de l'UII sur la $[Ca^{2+}]_c$.

Nos enregistrements électrophysiologiques réalisés sur les astrocytes de cervelet et sur les cellules CHO-UT exprimant le complexe $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ révèlent que l'UII exerce une modulation biphasique, *i.e.* une inhibition rapide du courant chlore pendant l'exposition au peptide, suivie d'une diminution progressive de l'amplitude du courant au cours du temps, jusqu'à entraîner une disparition de plus de 80% de la réponse GABAergique après 30 min. Nos travaux et les données de la littérature ont démontré que l'UT est couplé aux protéines G_{q/11}, G_s et/ou G_i, permettant d'envisager le rôle de l'UII dans l'activation de kinases et/ou de phosphatases responsable potentiellement d'un changement de l'état de phosphorylation du récepteur GABA_A. De fait, les sous-unités du récepteur GABA_A possèdent au niveau de leur seconde boucle intracellulaire de nombreux sites consensus de phosphorylation impliqués dans la régulation de la fonction du récepteur (Moss and Smart, 1996 ; Brandon *et al.*, 2002b ; Luscher and Keller, 2004). Ainsi, différents bloqueurs des voies de signalisation associées à l'UT ont été utilisés. Nous montrons que le blocage du couplage de l'UT aux protéines G par

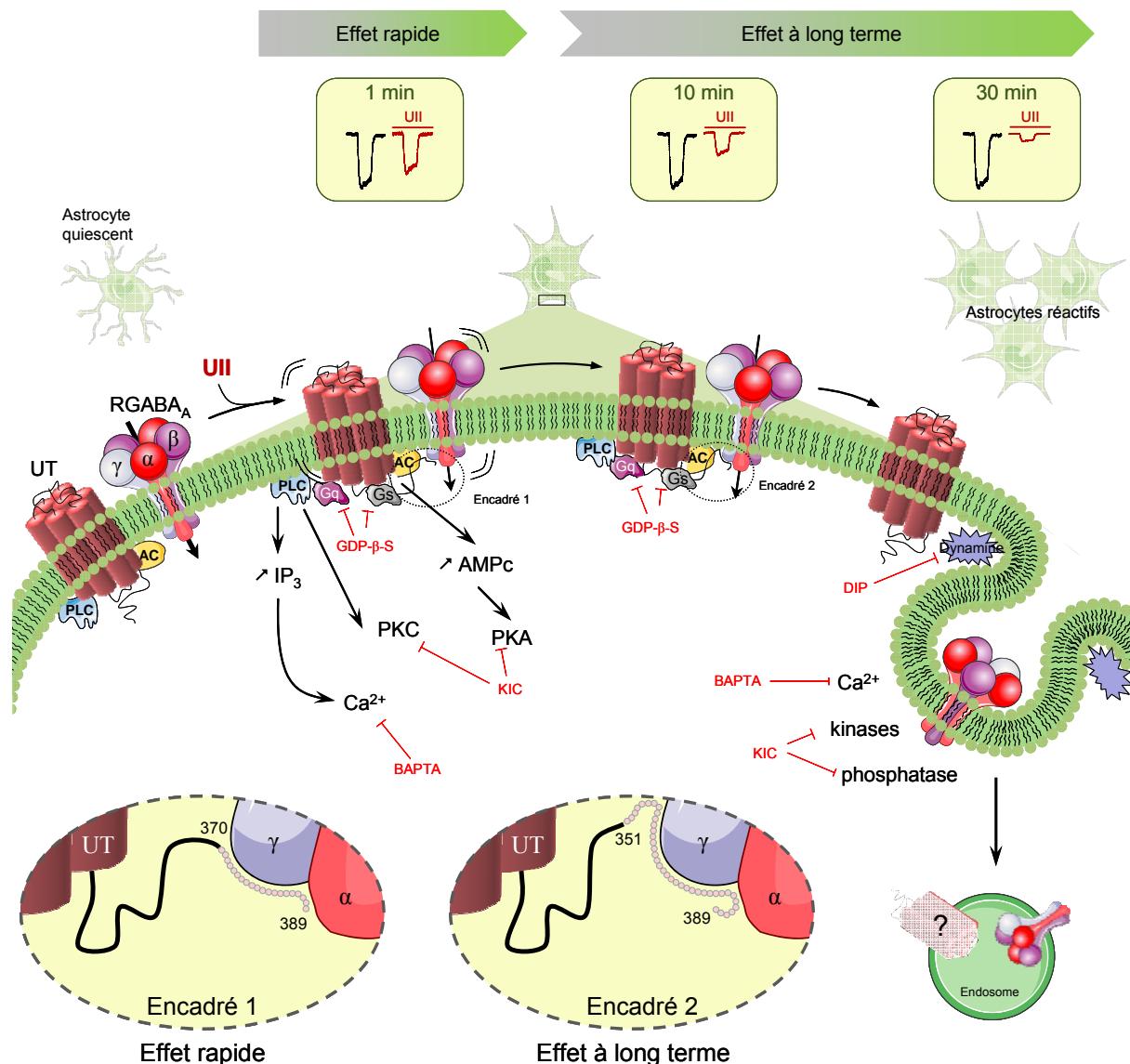


Figure 23 : Représentation schématique du mécanisme d'inhibition de l'activité du récepteur GABA_A par l'UT. L'activation de l'UT entraîne une inhibition rapide du courant GABA_A immédiatement après l'application d'UII, via un mécanisme indépendant des protéines G, du calcium, ou des kinases/phosphatases intracellulaires, qui implique la séquence 370-389 du fragment C_{term} de l'UT et la sous-unité γ du récepteur GABA_A (*Encadré 1*). Au cours de la période de rinçage, l'inhibition du courant chlore au cours du temps conduit à la disparition quasi-totale de l'activité GABAergic. Ce phénomène est dû à l'internalisation du complexe GABA_A après recrutement de la dynamine, via un mécanisme impliquant le calcium et des processus d'endocytose phospho-dépendants. Dans ce dernier cas, l'interaction nécessite la séquence minimum 351-370 du fragment C_{term} de l'UT et certains domaines des sous-unité γ du récepteur GABA_A (*Encadré 2*). Un tel couplage fonctionnel permettrait d'expliquer comment la perte du rôle répresseur du récepteur GABA_A favorise l'activation et la prolifération des astrocytes en condition physiopathologique.

le GTP-β-S ne modifie pas les effets rapide et à long terme de l'UII. Afin d'éliminer l'implication du calcium et des kinases/phosphatases intracellulaires, nous avons enregistré les modifications de la $[Ca^{2+}]_c$ dans les CHO-UT simultanément aux enregistrements

électrophysiologiques. L'inhibition du courant chlore engendrée par l'UII précède de plusieurs secondes la stimulation de la $[Ca^{2+}]_c$ induite par le peptide, démontrant ainsi que le calcium n'est pas impliqué dans l'effet rapide de l'UII, alors que l'inhibition observée à long terme est partiellement bloquée en présence de BAPTA, un chélateur de calcium. Considérant le nombre élevé de protéines kinase et phosphatase capables de réguler l'activité du récepteur GABA_A (Brandon *et al.*, 2002b ; Luscher and Keller, 2004), nous avons utilisé des inhibiteurs de kinases à large spectre combinés à un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases. Dans ces conditions, l'inhibition rapide du courant persiste, et l'effet à long terme de l'UII n'est que partiellement atténué. L'ensemble de ces observations suggère que l'étape d'initiation de l'interaction fonctionnelle entre l'UT et le récepteur GABA_A est totalement indépendante du calcium et des mécanismes classiques de phosphorylation, mais que ces processus interviennent ensuite dans l'extinction progressive de la réponse au GABA. En effet, Pryor *et al.* (2000) ont montré l'implication du complexe Ca²⁺/calmoduline dans le processus d'endocytose, et plusieurs études confèrent aux kinases et phosphatases un rôle essentiel dans l'internalisation des RCPG (Lin *et al.*, 1997 ; Naga Prasad *et al.*, 2005).

Parmi les nombreux processus de régulation de l'activité du récepteur GABA_A, les mécanismes d'insertion à la membrane et d'internalisation sont sans doute ceux qui ont été les plus étudiés au cours de ces dernières années. Ces travaux révèlent que les complexes récepteur sont sans cesse renouvelés *via* leur internalisation impliquant la formation de puits de clathrine et le recrutement de la dynamine (Kittler *et al.*, 2000a ; Bogdanov *et al.*, 2006 ; Bradley *et al.*, 2008). Ainsi, afin de déterminer le rôle de l'endocytose dans la régulation du nombre de récepteurs GABA_A présents à la membrane, nous avons étudié les effets de l'UII en présence du *dynamin inhibitory peptide* (DIP), un peptide bloquant l'interaction de la dynamine à l'amphiphysine, étape indispensable à l'initiation de l'endocytose (Grabs *et al.*, 1997 ; Kittler *et al.*, 2000a). L'application intracellulaire du DIP ne modifie par l'inhibition rapide du courant, mais abolit totalement l'effet de l'UII à long terme, suggérant très fortement que l'UT régule la fonction GABAergique en provoquant l'internalisation du récepteur GABA_A.

Nous avons démontré que les effets de l'UII nécessitent la présence au sein du complexe GABA_A d'une sous-unité γ . Etant donné que l'internalisation du récepteur GABA_A met en jeu les sous-unités β et γ qui, en se fixant au complexe AP2, permettent d'initier le processus d'endocytose (Herring *et al.*, 2003 ; Kittler and Moss, 2003 ; Kittler *et al.*, 2005, 2008), nous avons testé la capacité des ligands de chacun des deux récepteurs à induire l'internalisation du récepteur GABA_A. Sur les lignées exprimant uniquement le récepteur GABA_A, nous montrons que l'UII ne modifie pas le nombre de récepteurs à la membrane plasmique, alors que l'isoguvacine provoque leur internalisation. Lorsque l'UT et le récepteur GABA_A sont co-exprimés, l'UII mime l'effet de l'isoguvacine, c'est-à-dire qu'elle provoque la translocation du récepteur GABA_A de la membrane vers le cytosol. Ainsi, ces données confirment le rôle initiateur du peptide UII dans le processus d'internalisation du récepteur GABA_A, et ceci en l'absence d'agoniste du récepteur canal.

6. Caractérisation des séquences d'interaction entre l'UT et le récepteur GABA_A

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'UII inhibe rapidement le courant chlore et induit l'internalisation du récepteur GABA_A restent à déterminer. Afin de rechercher le motif d'interaction de l'UT au récepteur GABA_A, différents mutants de l'UT dont le domaine C_{term} cytosolique est tronqué de 19 (UT₃₇₀), 38 (UT₃₅₁), 57 (UT₃₃₂) et 70 (UT₃₁₉) acides aminés, respectivement, ont été générés. La délétion des 57 acides aminés ne modifie ni l'expression à la membrane, ni la capacité des mutants tronqués à stimuler la [Ca²⁺]_c. En 2005, Proulx *et al.* ont décrit que la délétion des 50 derniers acides aminés de l'UT de Rat ne modifie pas la liaison de l'UII au récepteur, la translocation à la membrane plasmique, et les voies de couplage à la protéine ERK et au métabolisme des PIPs. Lorsque le récepteur GABA_A est co-exprimé avec l'UT₃₇₀, l'action rapide de l'UII est abolie et l'inhibition à long terme est retardée, alors qu'en présence des mutants UT₃₅₁, UT₃₃₂ ou UT₃₁₉, l'effet inhibiteur de l'UII à et long termes sur la fonction GABAergique disparaît. De plus, l'expression concomitante du peptidomimétique correspondant au fragment C_{term} de l'UT bloque les effets de l'UII. Ainsi, nous montrons que le fragment distal 351-389 de l'UT joue un rôle majeur dans la modulation

de l'activité du récepteur GABA_A par l'UII. Ce domaine contient deux motifs poly-proline de type I et II, spécifiques du récepteur humain, qui relayent classiquement l'interaction à des protéines intracellulaires à domaines de type SH3 (Cao *et al.*, 2000 ; Agrawal and Kishan, 2002). Dans leur étude, Proulx *et al.* (2005) ont également montré que les 19 derniers acides aminés du fragment C_{term} de l'UT de Rat ne sont pas impliqués dans l'internalisation du récepteur, alors que le *cluster* de résidus sérine situé en position 364-367, qui constitue un motif consensus pour la PKC et la caséine kinase 1, joue un rôle crucial. Ainsi, la question du rôle exact de la séquence 370-389 de l'UT humain dans l'inhibition de la fonction du récepteur GABA_A reste non résolue.

L'absence d'effet de l'UII sur les complexes uniquement constitués des isoformes α et β nous a conduit à considérer γ comme une sous-unité clé du processus d'interaction entre l'UT et le récepteur GABA_A, et à proposer la seconde boucle intracellulaire de γ comme cible potentielle directe ou indirecte de l'UT. Sur cette base, nous avons étudié la capacité de l'UII à inhiber le courant GABA_A dans des cellules CHO-UT exprimant un récepteur GABA_A de type $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, en présence de peptidomimétiques correspondant aux boucles i_2 des sous-unités α_2 , β_3 et γ_2 . Cette stratégie a notamment permis à Liu *et al.* (2000) de démontrer l'existence d'une interaction directe entre le récepteur dopaminergique D₅ et le récepteur GABA_A. Toutefois, dans notre étude, aucun de ces peptides n'a pu bloquer l'effet rapide de l'UII, même si chacun d'entre eux réduit l'inhibition du courant à long terme. Ces résultats peuvent s'expliquer par un trop faible niveau d'expression de ces boucles, et/ou par l'absence d'un repliement correct permettant d'interagir avec la séquence cible. Une solution alternative consisterait à cycliser nos boucles, méthode employée par Granier *et al.* (2004) pour la synthèse de la 3^{ème} boucle intracellulaire du récepteur de vasopressine. Nous avons également émis l'hypothèse selon laquelle la seconde boucle intracellulaire de la sous-unité γ ne constitue pas la zone de contact avec l'UT. Notamment, parmi les nombreuses protéines d'interaction à la sous-unité γ_2 , la protéine CAML, identifiée pour son rôle dans la régulation de l'expression à la membrane plasmique du récepteur GABA_A, interagit, entre autre, au niveau du 4^{ème} domaine transmembranaire (Alldred *et al.*, 2005).

Conclusion & Perspectives

Conclusion & Perspectives —

Au terme de cette étude, nous avons montré l'existence, dans les astrocytes, d'une interaction fonctionnelle bidirectionnelle entre le récepteur GABA_A et le récepteur couplé aux protéines G du peptide vasoactif urotensine II. L'activation du récepteur GABA_A inhibe les effets de l'UTI sur le métabolisme des PIPs ainsi que sur la production d'AMPc, révélant l'existence d'une régulation négative de la fonction urotensinergique par le récepteur GABA_A. Réciproquement, l'activation de l'UT provoque une inhibition marquée et non réversible du courant évoqué par le GABA, résultant de l'internalisation du récepteur GABA_A. Cette extinction progressive de l'expression du récepteur GABA_A à la membrane plasmique en réponse à l'UTI est indépendante du couplage de l'UT aux protéines G, mais implique en partie le calcium, des kinases et/ou phosphatases intracellulaires, et est relayée par le recrutement de la dynamine et l'endocytose du récepteur canal chlore. Ce couplage fonctionnel met en jeu le fragment cytosolique C-terminal de l'UT, et notamment le domaine 351-389, et nécessite la présence d'une sous-unité γ associée au complexe récepteur GABA_A. La rapidité d'action de l'UTI sur le courant GABA impliquant le fragment le plus distal de l'UT, et l'absence de blocage par des inhibiteurs de voies de transductions associées à la phosphorylation, suggèrent l'existence d'un couplage "direct" entre l'UT et le récepteur GABA_A. L'ensemble de ces données propose une piste permettant d'expliquer comment la perte du rôle répresseur du récepteur GABA_A dans les astrocytes réactifs ou malins, pourrait favoriser la prolifération astrocytaire en conditions physiopathologiques, notamment au cours de lésions cérébrales ischémiques, lorsque des facteurs vasoactifs sont sur-exprimés. Des études antérieures avaient déjà démontré l'existence d'une modulation fonctionnelle des récepteur-canaux dont le récepteur GABA_A, par des récepteurs couplés aux protéines G incluant les récepteurs D₁, D₂ et D₃ dopaminergiques (Brünig *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2006) ou récepteurs tyrosine kinase, tels que le récepteur Trk du BDNF (Elmariyah *et al.*, 2005). De

plus, la preuve d'une interaction physique entre le récepteur GABA_A et le récepteur D₅ dopaminergique (Liu *et al.*, 2000) responsable de leur régulation négative bidirectionnelle, ouvre la possibilité d'une hétérodimérisation entre l'UT et le récepteur GABA_A dans notre présente étude. Les données dont nous disposons à l'heure actuelle ne permettant pas de conclure quant au mécanisme exact d'interaction UT-récepteur GABA_A, la poursuite de ces travaux consistera donc dans un premier temps à *i*) mettre en évidence l'association physique de l'UT au récepteur GABA_A dans un modèle recombinant et *ii*) caractériser les séquences de chacun des deux récepteurs impliquées dans ce processus. Dans un second temps, nous rechercherons l'existence d'une telle interaction dans les astrocytes, et son implication potentielle au cours du processus d'astrogliose qui surviendrait par exemple, après un accident ischémique cérébral.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Laurent Prézeau (UMR 5203/Inserm U661, Montpellier), des études préliminaires utilisant les technologies de transfert d'énergie entre deux fluorochromes, les technologies BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) et FRET-HTRF (*Homogeneous time-resolved fluorescence*) ont d'ores et déjà été menées sur des cellules HEK293 co-exprimant l'UT fusionné à la YFP (*yellow fluorescent protein*) et RLuc (*Renilla Luciferase*) pour le BRET (dimères UT-UT) et aux épitopes snap-FLAG et snap-HA pour le FRET-HTRF (dimères UT-UT, hétéromères UT-GABA_A). Dans ce dernier cas, la technique "snap" consiste à fusionner le domaine catalytique de la O6-alkylguanine-DNA alkyltransférase au niveau d'une protéine cible, le récepteur UT ou la sous-unité γ_2 , afin de marquer spécifiquement, par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique, la protéine de fusion au cryptate d'europium (donneur) et/ou au fluorochrome accepteur d2. Dans notre étude, grâce à une collaboration avec Cisbio International (Bagnols-sur-Cèze, France), le cryptate (donneur) est directement couplé au snap-HA, alors qu'un anticorps dirigé contre le FLAG est couplé à l'accepteur d2, permettant la mesure du transfert d'énergie entre les deux récepteurs, s'ils sont suffisamment proches (<100 Å), et si les dipôles sont correctement orientés. Les résultats de BRET et FRET-HTRF obtenus par Céline Lecointre (Doctorante dans notre équipe) montrent que l'UT est exprimé constitutivement sous forme

d'homodimères. Ces données sont confortées par les études de co-immunoprecipitation du Dr Laurence Desrues (Ingénieur de Recherche dans notre équipe) démontrant que l'UT^{c-myc} est co-immunoprecipité par l'anticorps anti-HA, lorsque les récepteurs UT^{HA} et UT^{c-myc} sont co-exprimés dans la lignée CHO. En revanche, nos données ne permettent pas de conclure quant à l'existence d'une interaction physique entre l'UT et la sous-unité γ_2 du récepteur GABA_A, en raison de problèmes d'expression du récepteur GABA_A à un niveau compatible avec la réalisation de l'expérience FRET-HTRF. L'utilisation d'une lignée HEK exprimant stablement les sous-unités α_2 , β_3 et $\gamma_2^{SNAP-Flag}$, transfectée transitoirement avec l'ADNc de l'UT^{snapHA}, permettrait d'améliorer la détection du signal. Bien sûr, d'autres variants de la méthodologie devraient aussi être testés.

Les données de la littérature sur la dimérisation des récepteurs rapportent une grande hétérogénéité dans les domaines impliqués, *i.e.* domaines N_{term}, C_{term} et/ou transmembranaires (Breitwieser, 2004). Nos données révèlent un rôle majeur du fragment C_{term} (351-389) de l'UT dans les effets de l'UII sur la fonction GABAergique, mais n'ont pas permis de clairement identifier le(s) domaine(s) du récepteur GABA_A nécessaire(s) à l'interaction. Afin de rechercher la nature des séquences récepteur impliquées dans une telle interaction physique, nous testerons en co-immunoprecipitation et FRET-HTRF, les mutants de l'UT (UT₃₇₀, UT₃₅₁, UT₃₃₂ et UT₃₁₉) et ainsi que les sous-unités du récepteur GABA_A mutées dans la séquence de leur seconde boucle intracellulaire. Nous rechercherons également si la formation d'une telle interaction est de nature constitutive (dès le RE), ou si elle est de nature dynamique à la membrane plasmique, dépendant ainsi de la liaison de l'un, l'autre ou chacun des ligands des deux récepteurs.

La question majeure à laquelle nous tenterons de répondre dans une deuxième partie concerne l'existence de ces dimères UT/récepteur GABA_A *in vivo*, et leur implication fonctionnelle dans la prolifération astrocytaire. Après une lésion de type ischémique, la "cicatrice gliale" qui se forme délimite le site de la lésion et restaure l'isolement du système nerveux par rapport à la périphérie en reformant une '*glia limitans*'. Cependant, même si cette structure entrave la repousse axonale en formant un barrière mécanique et constitue un frein à

la récupération post-lésionnelle, l'élimination des astrocytes réactifs accentue de nombreux paramètres pathologiques et agrave des lésions de faible intensité (Bush *et al.*, 1999 ; Faulkner *et al.*, 2004). Ralentir ou limiter la cicatrice gliale, tout en préservant la capacité des astrocytes réactifs à libérer leurs facteurs neurotrophiques, constituerait donc un axe d'étude pour favoriser la reconstruction structurelle et fonctionnelle de voies nerveuses au sein du tissu lésé. Nous rechercherons ainsi la présence de ces dimères de récepteur dans des cultures d'astrocytes *via* une approche FRET-HTRF et de co-immunoprécipitation à l'aide de ligands urotensinergique et GABAergique, étiquetés par des donneurs et accepteurs de FRET (Cisbio). Ainsi, considérant *i)* les effets mitogènes de l'UII sur les astrocytes (Jarry *et al.*, *in press*), *ii)* le rôle répresseur du récepteur GABA_A sur la prolifération cellulaire (Tateishi *et al.*, 2006), et *iii)* l'inhibition de la fonction GABAergique par l'UII, nous envisageons d'étudier sur des astrocytes activés *in situ* après ischémie cérébrale, si les deux récepteurs peuvent s'associer physiquement, conduisant à la perte du récepteur GABA_A à la membrane et à la prolifération astrocytaire.

Travaux Scientifiques Annexes

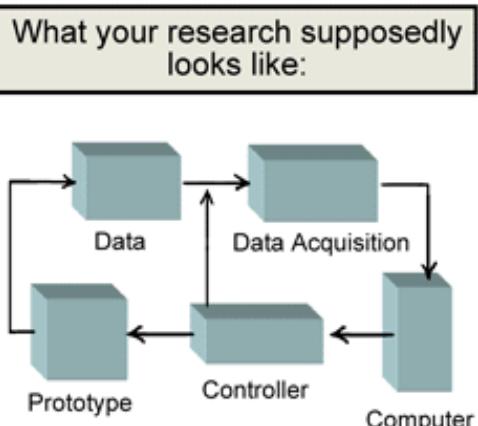


Figure 1. Experimental Diagram

What your research *actually* looks like:

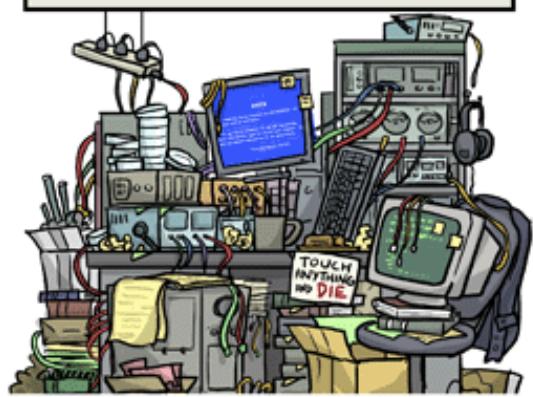


Figure 2. Experimental Mess

JORGE CHAM © 2008

WWW.PHDCOMICS.COM

Travaux scientifiques annexes

Article III :

Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons

Thomas Lefebvre, Bruno Gonzalez, David Vaudry, Laurence Desrues, Falluel-Morel Anthony, Aubert Nicolas, Alain Fournier, Marie-Christine Tonon, Hubert Vaudry and Hélène Castel

J. Neurochem. (2009) **110**:976–989

Dans cette étude, nous avons montré que les effets de l'EtOH sur la survie des neurones en grain du cervelet mettent en jeu des canaux potassiques. A faible concentration (10 mM), l'EtOH provoque une dépolarisation membranaire et une inhibition du courant potassique d'inactivation rapide I_A . A plus forte concentration (400 mM), l'EtOH est responsable d'une hyperpolarisation membranaire et d'une stimulation du courant potassique de la rectification retardée I_K . Nos études de survie cellulaire révèlent que l'EtOH 200 et 400 mM exerce des effets neurotoxiques qui impliquent l'activation de I_K . A l'inverse, l'EtOH 10 mM favorise la survie des neurones en grain, un effet qui est mimé par le bloqueur spécifique du canal I_A .

Ces résultats démontrent que l'EtOH induit un effet bidirectionnel sur la survie des neurones en grain du cervelet qui implique les canaux potassiques I_K et I_A .

Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons

Thomas Lefebvre,* Bruno J. Gonzalez,*†‡ David Vaudry,* Laurence Desrues,*
 Antony Falluel-Morel,* Nicolas Aubert,*§ Alain Fournier,¶ Marie-Christine Tonon,*
 Hubert Vaudry* and Hélène Castel*

*Inserm U413, Laboratory of Neuroendocrine and Neuronal Cell Differentiation and Communication, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

†NeoVascular Laboratory of Microvascular Endothelium and Neonate Brain Lesions, Rouen Institute for Biomedical Research, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

‡Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Rouen University Hospital, Rouen, France

§International Center of Toxicology, Evreux, France

¶Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand Frappier, University of Québec, Pointe-Claire, Canada

Abstract

Transient exposure to ethanol (EtOH) results in a massive neurodegeneration in the developing brain leading to behavioral and cognitive deficits observed in fetal alcohol syndrome. There is now compelling evidence that K⁺ channels play an important role in the control of programmed cell death. The aim of the present work was to investigate the involvement of K⁺ channels in the EtOH-induced cerebellar granule cell death and/or survival. At low and high concentrations, EtOH evoked membrane depolarization and hyperpolarization, respectively. Bath perfusion of EtOH (10 mM) depressed the I_A (transient K⁺ current) potassium current whereas EtOH (400 mM) provoked a marked potentiation of the specific I_K (delayed recti-

fier K⁺ current). Pipette dialysis with GTPγS or GDPβS did not modify the effects of EtOH (400 mM) on both membrane potential and I_K current. In contrast, the reversible depolarization and slowly recovering inhibition of I_A induced by EtOH (10 mM) became irreversible in the presence of GTPγS. EtOH (400 mM) induced prodeath responses whereas EtOH (10 mM) and K⁺ channel blockers promoted cell survival. Altogether, these results indicate that in cerebellar granule cells, EtOH mediates a dual effect on K⁺ currents partly involved in the control of granule cell death.

Keywords: cell survival, delayed rectifier, ethanol, fast-inactivating, granule neuron, potassium currents.

J. Neurochem. (2009) **110**, 976–989.

In human, prenatal exposure to ethanol (EtOH) results in facial dysmorphologies (Hoyme *et al.* 2005) and developmental retardation associated to behavioral and cognitive deficits termed fetal alcohol syndrome (Mattson and Riley 1998). In rodents, these neuropathological features have been correlated to impairments in cell proliferation, survival and/or neuronal migration in various brain areas (Ikonomidou *et al.* 2000; Goodlett and Horn 2001; Jiang *et al.* 2008). The cerebellum is one of the brain areas that is most sensitive to EtOH during development, with loss of both Purkinje neurons (Goodlett *et al.* 1998) and granule cells (Hamre and West 1993). However, an age-related change in alcohol vulnerability has been observed in cerebellar granule cells (Hamre and West 1993; Bonthius *et al.* 2004). Addition of EtOH to cells freshly isolated or incubated under

non-depolarizing conditions was reported to exacerbate apoptosis of immature neurons (Pantazis *et al.* 1993; Bhave and Hoffman 1997; Vaudry *et al.* 2002). With continued time in culture, granule cells acquire a more mature neuronal

Received December 23, 2008; revised manuscript received May 4, 2009; accepted May 20, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Hélène Castel, Inserm U413, EA4310, DC2N, Laboratory of Neuroendocrine and Neuronal Cell Differentiation and Communication, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan 76821, France. E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr

Abbreviations used: 4-AP, 4-aminopyridine; DIV, days *in vitro*; EtOH, ethanol; FDA, fluorescein diacetate; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; TEA, tetraethylammonium chloride; TTX, tetrodotoxin; FCS, fetal calf serum.

phenotype including extension of neurites, expression of sialoglycoproteins, cell adhesion proteins and receptors, and delayed rectifier potassium channels (I_K) (Zheng *et al.* 1994; Hatten and Heintz 1995; Wang *et al.* 1995; Mei *et al.* 2004), and appear more resistant to the neurotoxic action of EtOH (Pantazis *et al.* 1993; Oberdoerster and Rabin 1999).

Ethanol has been shown to interact with a wide variety of neurotransmitter receptors and voltage-gated ion channels where presumed alcohol binding sites have been identified (Covarrubias *et al.* 1995; Lewohl *et al.* 1999; Ren *et al.* 2003). In particular, EtOH stimulates the activity of most of maxi-K channels (BK) from a diversity of cells and tissues (Brodie *et al.* 2007) and of G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels (Lewohl *et al.* 1999) whereas it excites dopamine neurons by reducing a quinidine-sensitive delayed rectifier K⁺ channel (Appel *et al.* 2003) or inhibits a drosophila Shaw2 channel and a twin-pore K⁺ channel (Covarrubias *et al.* 1995).

At cellular and molecular levels, apoptosis is characterized by a series of morphological and biochemical changes that include cell shrinkage, caspase activation, and DNA fragmentation. One of the early features of apoptosis is the decrease in intracellular K⁺ accompanying cell shrinkage (Remillard and Yuan 2004) that ultimately leads to death in various cell types including lymphocytes (Elliott and Higgins 2003), fibroblasts (Brevnova *et al.* 2004), smooth muscle cells (Orlov *et al.* 2004), and cortical neurons (Pal *et al.* 2003). Voltage-dependent K⁺ channels play a critical role in mediating the K⁺ efflux associated with apoptotic cell shrinkage (Yu *et al.* 1997), and blockage of potassium channel activity has been shown to reduce and/or prevent apoptosis (Yu 2003). Moreover, previous reports showed that fast inactivating currents [transient K⁺ current (I_A)] mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells (Krick *et al.* 2001; Brevnova *et al.* 2004) while reduction of I_A was associated with a decreased cell apoptosis in olfactory neurons (Han and Lucero 2005). Little is known about EtOH effects on synaptic transmission in cerebellar granule cells. Our previous studies demonstrated that the neuroprotective agent, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), prevented cerebellar granule neurons from apoptotic cell death induced by EtOH (Vaudry *et al.* 2002; Mei *et al.* 2004) through, at least in part, inhibition of I_K currents. However, the effects of EtOH on the different K⁺ currents expressed in granule cells remain unknown.

Primary cultures of cerebellar granule cells have been shown to possess various voltage-gated outward K⁺ currents, including fast transient outward (I_A) and I_K (Mathie *et al.* 2003; Watkins and Mathie, 1996; Mei *et al.* 2004). By using specific voltage-gated ion channels blockers, the present study addressed the question of the mechanism by which EtOH directly modulated the electrical activity of cerebellar granule neurons and consequently granule cells survival. Here we showed that at high concentration EtOH hyperpolarized cells

and stimulated I_K current amplitude whereas at low concentration it induced depolarization and I_A current inhibition, both involved in the control of granule neurons survival.

Material and methods

Chemicals

ATP, GTP, GTPγS, GDPβS, the Na⁺ channel blocker tetrodotoxin (TTX), the K⁺ channels opener diclofenac, the transient outward K⁺ current (I_A) blocker 4-aminopyridine (4-AP); the sustained I_K blocker tetraethylammonium chloride (TEA), fluoresceine diacetate, Dulbecco's modified Eagle's medium, Ham-F12 culture medium, insulin, fetal calf serum (FCS), and cytosine β-D-arabinofuranoside were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Glutamine and the antibiotic-antimycotic solution were purchased from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). EtOH was obtained from VWR International (Strasbourg, France). ATP, GTP, GTPγS, or GDPβS were administered through the patch pipette solution. The channels blockers or opener were perfused via gravity through a plastic tubing positioned in the vicinity of the cell body in order to maintain a sustained perfusion. In these conditions, drugs could reach the cell of interest after 30 s of perfusion.

Primary neuronal culture

Granule cell cultures were prepared from cerebella of 8-day-old Wistar rats as previously described (Gonzalez *et al.* 1992). Isolated cells were plated on 35-mm culture dishes coated with poly-L-lysine (5×10^{-3} M) at a density of 1.5×10^6 cells per dish and incubated at 37°C under controlled atmosphere (5% CO₂/95% air) for 1 to 8 days before use. Culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F12 (75%/25%) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 5 µg/mL insulin, 25 mM KCl, and 1% of antibiotic-antimycotic solution. Proliferation of non-neuronal cells was suppressed by addition of cytosine β-D-arabinofuranoside (5 µM) 24 h after seeding.

Exposure of cerebellar granule cells to alcohol

For electrophysiology and cell survival studies, the alcohol concentrations used varied from 1 to 400 mM (equivalent to 4.46–1784 mg/dL). This large range of concentrations was chosen for several reasons: (i) it covered both the large range of alcohol concentrations used in the literature to treat cultured neurons *in vitro* (up to 1600 mg/dL; Zhong *et al.* 2006) and the blood alcohol concentrations were typically observed *in vivo* in moderate to heavy drinkers (50–400 mg/dL) and (ii) because the alcohol metabolism was different between brain and blood. Indeed, it has been shown that EtOH can accumulate into the brain and that it is eliminated more slowly than from plasma (Chen *et al.* 2007).

Ethanol was prepared extemporaneously. In patch-clamp experiments, the effects of graded concentrations of EtOH were measured by perfusion via gravity through a plastic tubing positioned in the vicinity of the cell body. In the other electrophysiological experiments, EtOH was applied focally by pneumatic pressure. For measurement of cell viability, 7 days *in vitro* (DIV) granule neurons medium was removed and replaced by a 5 mM/serum-free medium in the absence or presence of different concentrations of EtOH for a 18-h period.

Electrophysiological recordings

Whole-cell K⁺ currents were recorded at room temperature (20–22°C) using the standard patch-clamp technique on cerebellar granule neurons between 5 and 10 DIV. For measurement of the membrane potential or current in standard conditions, the culture medium was replaced by a bath solution containing (in mM): NaCl, 145; KCl, 2.5; HEPES, 10; MgCl₂, 1; and glucose, 10 (pH 7.4 adjusted with NaOH). For potassium currents recordings, the culture medium was replaced by a bath solution containing (in mM): NaCl, 145; KCl, 2.5; HEPES, 10; MgCl₂, 1; TTX, 0.001; and glucose, 10 (pH 7.4 adjusted with NaOH). The fast-inactivating potassium current I_A was blocked with 4-AP (5 mM) leaving only the non-inactivating potassium (I_K) current whereas I_K was blocked by TEA (20 mM) leaving only I_A currents. The patch pipettes were fabricated from 1.5 mm (outer diameter) soft glass tubes on a two-step vertical pipette puller (List-Medical; L/M-3P-A, Darmstadt, Germany). Patch electrodes had a final resistance of 6–8 MΩ when filled with an internal pipette solution containing (in mM): KCl, 140; MgCl₂, 4; EGTA, 5; HEPES, 10; ATP, 1; and GTP, 0.1 (pH 7.4 adjusted with KOH).

Data acquisition and analysis

All current signals were amplified from an Axopatch 200A Amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA) and filtered at 2 kHz (3 dB, four-pole, low-pass Bessel filter). Data acquisition and analysis were performed through a digitata 1200 interface using the pClamp 8 suite programs (Axon Instruments) and/or the Origin 4.1 analysis software (Microcal Software, Northampton, MA, USA). In current-clamp mode, the input resistance of the cells was estimated in the linear portion of the voltage–current plots (8 ± 8 pA) from a holding potential arbitrary fixed at -60 mV by using the basal line adjustment procedure (Clampfit). Currents were corrected for leak and residual capacitance transients by a P/4 procedure within the acquisition program. Recording protocols for both I_K and I_A currents were achieved by stepping from a holding potential of -80 mV to +60 mV for 200 ms every 15 s. In some recordings, I_A and I_K were measured directly by stepping from holding potential of -80 mV to +60 mV or -50 mV to +50 mV for 200 ms, respectively. All values were given as means ± SEM. Student's *t*-tests were performed with paired comparison if relevant.

Measurement of cell survival

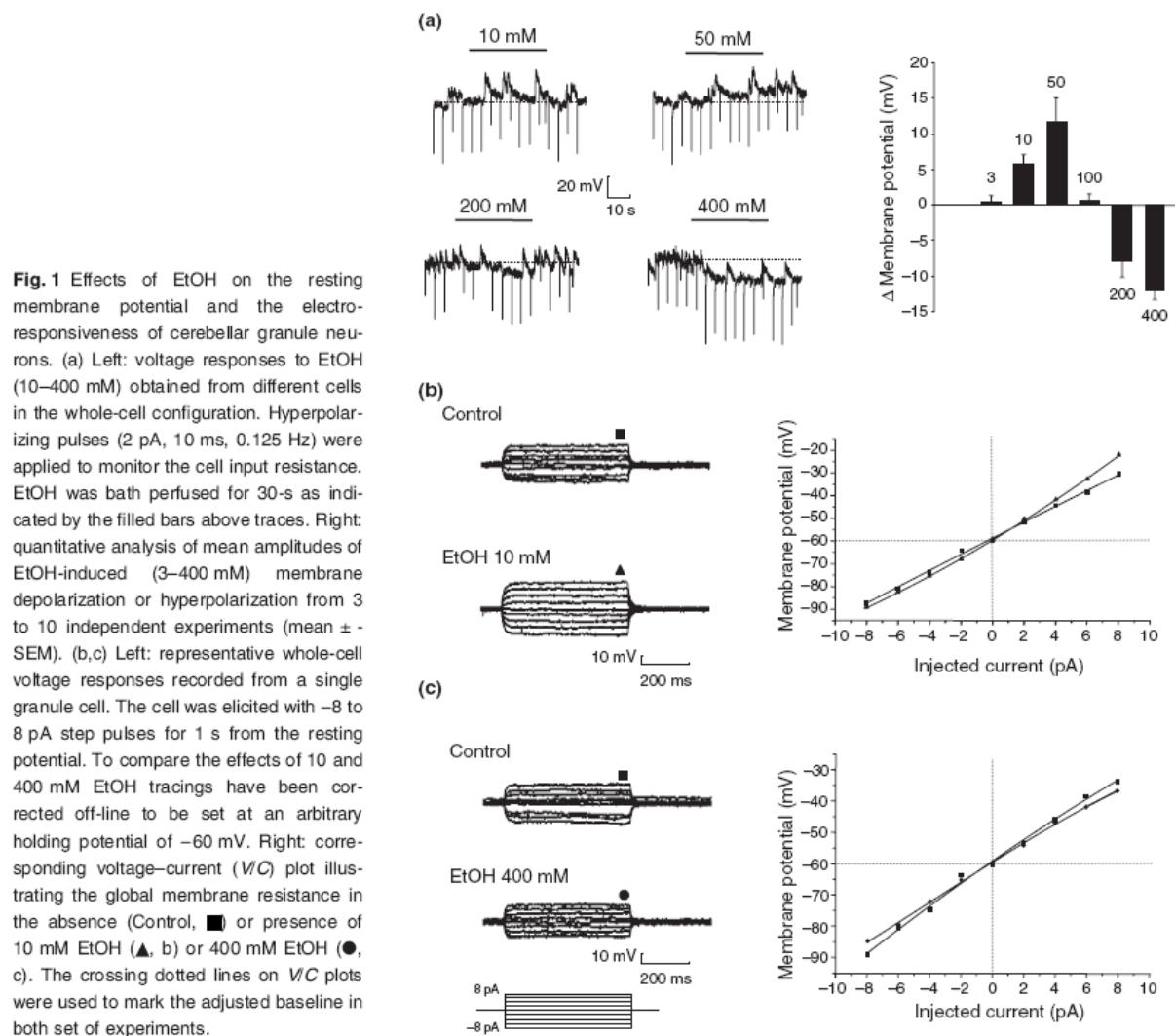
At 7 DIV, the culture medium containing 10% FCS was replaced by a 5 mM K⁺- and FCS-free medium supplemented by TEA (5 mM) and 4-AP (1 mM) in the absence or presence of 10 or 400 mM EtOH during 18 h. At the end of the 18-h period, cells were incubated for 8 min with 15 µg/mL calcein (producing green fluorescence in living cells) and 15 µg/mL propidium iodide (producing red fluorescence in dead cells), rinsed once with 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4), and examined on a Leica epifluorescence microscope (Leica France, Rueil-Malmaison, France). For quantification of surviving neurons, cells were incubated for 8 min with 15 µg/mL fluorescein diacetate (which produces green fluorescence in living neurons), rinsed once with phosphate-buffered saline, and lysed with a Tris-HCl solution. Fluorescence intensity was measured with a FL600 Fluorescence Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Experiments have shown that the fluorescence intensity is proportional to the cell number (Vaudry *et al.* 2000). Statistical significance of differences was determined by using the one-way ANOVA followed by a Kruskal-Wallis *post hoc* test.

Results

The effect of EtOH on the resting membrane potential of cerebellar neurons was studied in the whole-cell configuration using a patch-pipette containing 0.1 mM GTP. EtOH (10 and 50 mM) bath perfused near the cell soma-evoked cell membrane depolarizations associated in some cells to an increase of a spiking activity (Fig. 1a). An intermediate EtOH concentration (100 mM) did not affect the resting membrane potential whereas higher EtOH concentrations (200 and 400 mM) elicited a marked hyperpolarization (Fig. 1a). The concentration–response relationship of EtOH revealed that the polarity and the peak amplitude of responses were closely dependent on the concentration tested. The most effective depolarizations or hyperpolarizations were obtained with 10 and 50 mM EtOH (+5.8 ± 1.2 mV, n = 7 and +11.6 ± 3.5 mV, n = 6) or 200 and 400 mM EtOH (-8.0 ± 2.0 mV, n = 4 and -12.0 ± 1.4 mV, n = 9), respectively (Fig. 1a, right). To determine whether EtOH-mediated effects resulted from voltage-dependent channel opening and/or closing, successive current injections were applied for 1 s every 10 s from -8 to +8 pA with 2 pA increments from the cell resting potential (Fig. 1b and c). To compare the effect of injected current pulses, tracings have been corrected for an arbitrary holding membrane potential (-60 mV). Ten mM EtOH enhanced the amplitude of both hyperpolarizations and depolarizations evoked by injected currents (Fig. 1b, Left). The corresponding voltage/current (V/I) relationships fitted by a monoexponential revealed an EtOH-induced increase in the input resistance manifested by a slope changing and consecutively a decrease in the global membrane conductance (Fig. 1b, right). Conversely, 400 mM EtOH depressed the amplitude of the voltage responses to current injections changing the shape of the slope and then increasing the global membrane conductance (Fig. 1c).

Under whole-cell configuration and voltage-clamp mode with GTP in the internal pipette solution, the sensitivity and the relative proportion of the different K⁺ currents expressed in cerebellar granule cells have been tested by using specific blockers of I_A and I_K , 4-AP (5 mM) and TEA (20 mM) respectively. 4-AP inhibited the control K⁺ current by 46.6 ± 6.5% (n = 7) whereas the I_K blocker TEA reduced by 63.2 ± 7.6% (n = 8) the K⁺ current amplitude (data not shown). Instantaneous current/voltage (I/V) relationships of global K⁺ currents in standard bath solution were obtained by plotting the currents evoked by 200-ms voltage ramp from -80 to +60 mV against test pulse. The inhibition of I_A K⁺ current by 4-AP (5 mM) resulted in a global decrease in the



amplitude of outward currents evoked by instantaneous I/V curves (Fig. 2a). Bath perfusion of 4-AP (30–90 s) totally blocked the outward current at negative potentials (-80 to -40 mV) and partially reduced the current at more positive potentials (0 to $+60$ mV). Conversely, the inhibition of I_K by TEA (30–90 s) led to a reduced K^+ current amplitude evoked exclusively by depolarizations that arose mainly from potentials above 0 mV. The TEA-evoked strong inhibition slightly recovered after a 90-s washout (Fig. 2b). Bath perfusion with 10 and 50 mM EtOH (90 s) depressed the global outward K^+ current from -60 mV, an effect resembling to the specific inhibition of I_A by 4-AP (Fig. 2a, c and d). Interestingly, application of EtOH at a higher concentration (400 mM) resulted in a marked current stimulation between 0 and 60 mV (Fig. 2e). Global outward K^+ currents were also evoked by sequential 200-ms depolarizing pulses from -80 to $+60$ mV. Perfusion of granule cells (1 min) with

10 mM (Fig. 2f) and 400 mM (Fig. 2g) EtOH provoked significant and reversible decrease and increase in K^+ currents, respectively. After 1-min washout, current amplitudes recovered control levels indicating that EtOH-mediating both effects were reversible. In Fig. 2h, quantitative analysis showed a significant reduction of K^+ current amplitudes at 10 mM EtOH ($87.4 \pm 6.2\%$, peak; $80.8 \pm 7.0\%$, plateau; $n = 8$). Conversely, both peak and plateau components of the K^+ currents were significantly stimulated by 200 and 400 mM EtOH ($110.0 \pm 4.4\%$, peak; $120.8 \pm 3.9\%$, plateau; $n = 18$ and $116 \pm 4\%$, peak; $112 \pm 3\%$, plateau; $n = 16$).

The results described thereafter were obtained by using a bath solution containing 4-AP (5 mM) to block I_A , allowing specific activation of the I_K current by a depolarizing pulse to $+50$ mV from a holding potential of -50 mV. In 4-AP experimental conditions, 5–10 DIV-studied cerebellar

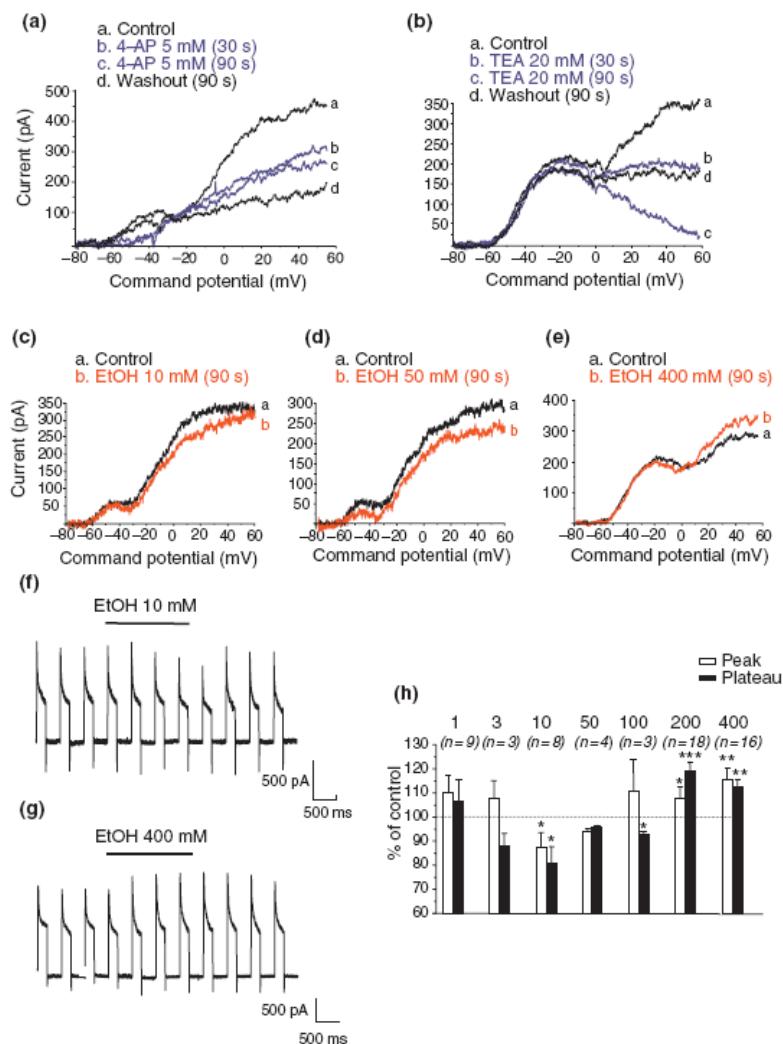


Fig. 2 Effects of K⁺ channel blockers and EtOH on voltage-activating outward K⁺ currents in rat cerebellar granule cells. Currents obtained following a voltage ramp from -80 to +60 mV at a rate of 1 mV/ms every 15 s. (a) Instantaneous current-voltage (I/V) relationships elicited by voltage ramps before (i), during 30 s (ii), 90 s (iii), and after (iv, 90 s) 4-AP (5 mM) perfusion. (b) Instantaneous I/V relationships elicited by voltage ramps before (i), during 30 s (ii), 90 s (iii), and after (iv, 90 s) TEA (20 mM) perfusion. (c–e) Instantaneous I/V relationships elicited by voltage ramps in the absence (i) or presence (ii, 90 s) of 10 mM (c), 50 mM (d), and 400 mM (e) EtOH perfusion, respectively. (f, g) Global K⁺ currents evoked by sequential 200-ms depolarizing pulses from -80 to +60 mV at 15-s intervals in the absence or presence of 10 mM EtOH (f, 1-min, horizontal bar) or 400 mM EtOH (g, 1-min, horizontal bar). (h) Quantification of global K⁺ current amplitudes measured at the beginning (peak) or the end (plateau) of the pulse protocol during a 30-s EtOH perfusion. The data represent the mean values (\pm SEM) obtained from 3 to 18 cells. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 versus control currents before EtOH application.

granule cells exhibited a mean resting membrane potential of -58 ± 3.2 mV ($n = 16$) and rather small I_K (234 ± 18 pA, $n = 58$) currents. As shown in Fig. 3a, a 5-s ejection of high EtOH concentrations (200 and 400 mM) elicited hyperpolarization by reducing mean resting membrane potentials from -57.7 ± 4.3 mV and -58.6 ± 2.1 mV to -63.4 ± 3.9 mV ($n = 5$) and -66.3 ± 2.3 mV ($n = 8$), respectively (Fig. 3b). This effect recovered immediately at the end of the drug application (Fig. 3a). EtOH-induced hyperpolarization and outward current were detected at holding potentials more positive than -80 mV (a value close to the K⁺ equilibrium potential predicted by the Nernst equation in the present experimental conditions) wherein the amplitudes increased towards depolarizing potentials (Fig. 3c and d). To examine the mechanism of action of high EtOH concentration on K⁺ channel gating characteristics, the effect of EtOH was studied in the presence of 4-AP (5 mM) on both the

activation and inactivation properties of the delayed outward K⁺ current I_K . EtOH concentration of 400 mM significantly modified the half-activated conductance values V_h from $+3.2 \pm 0.9$ mV (Control, $n = 6$) to -3.4 ± 0.9 mV (400 mM EtOH, $n = 6$). The data indicated that EtOH shifted the I_K activation curve towards more negative potentials and altered the slope factor of the inactivation curve (Table S1).

To investigate the possibility of a direct modulation of I_K channels by high concentrations of EtOH, we compared the potentiation induced by 200 or 400 mM EtOH to the effect of diclofenac (0.1 mM), a K⁺ channel opener, on both I_K current kinetic and amplitude in cerebellar granule cells. As shown in Fig. 4a, 200 and 400 mM EtOH significantly enhanced I_K by $115.7 \pm 2.5\%$ ($n = 7$) and $124.5 \pm 3.4\%$ ($n = 19$, $p < 0.001$), respectively, before it was recovered after a 15-s washout (Fig. 4a and c). Moreover, bath perfusion of diclofenac (0.1 mM) led to a

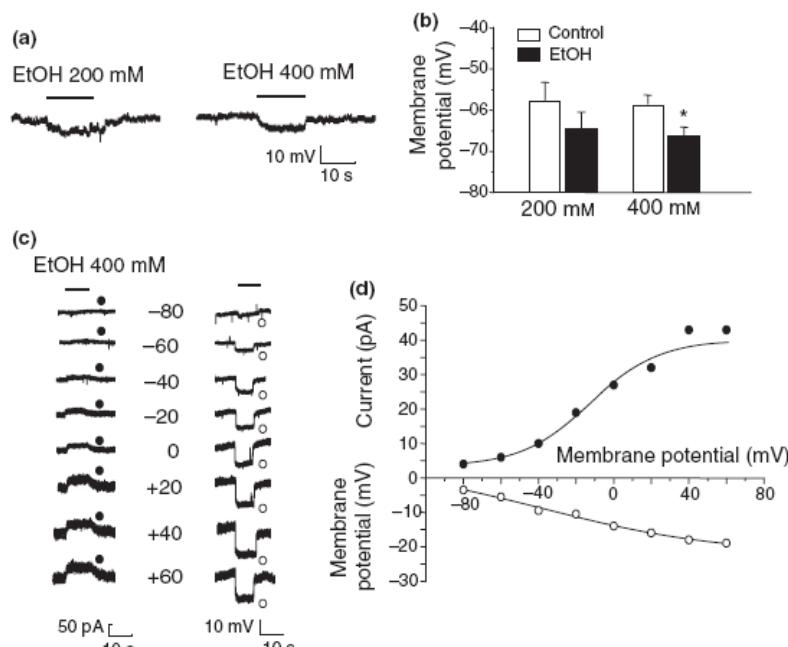


Fig. 3 Effect of high EtOH concentration on global membrane voltage and current in rat cerebellar granule cells. The fast-inactivating K⁺ current (I_A) was blocked by 4-AP (5 mM) when applied in the bath solution. (a) Voltage recordings of the effect of a 10-s ejection (horizontal bar) of EtOH at 200 (left) or 400 mM (right). (b) Quantification of the EtOH-induced membrane hyperpolarization. (c) Inward current (left) or hyperpolarization (right) caused by a 5-s EtOH (400 mM) ejection (horizontal bar) in two different cells held at potentials ranging from -80 to +60 mV in 20-mV increments. (d) Corresponding voltage/voltage (V/V) and current/voltage (I/V) plots of the EtOH-evoked hyperpolarizations or outward currents, yielding a reversal potential around -80 mV. The data represent the mean values (\pm SEM) obtained from five to eight cells. *p < 0.05 versus mean resting membrane potential.

robust ($p < 0.001$) increase in I_K by $239 \pm 47\%$ ($n = 5$, Fig. 4b and c). This activation process occurred rapidly, reached a high potentiation within 45-s application, and recovered to control level after only 15-s washout (Fig. 4b). In order to investigate a possible contribution of G proteins in the stimulatory effect of high EtOH concentrations on I_K currents, the non-hydrolyzable analogs of GTP and GDP, GTP γ S (0.1 mM) and GDP β S (0.1 mM), respectively, were used to substitute GTP in the pipette solution. In GTP γ S- or GDP β S-dialyzed cells, the kinetics and amplitudes of membrane potential changes or I_K current potentiations were not drastically modified (Fig. 4d and e). Quantification of the data indicated that the EtOH-induced hyperpolarization or current increase in the presence of GTP γ S (-6.0 ± 0.1 mV, $n = 3$ or $117.6 \pm 2.3\%$, $n = 5$) and GDP β S (-5.6 ± 0.6 mV, $n = 5$ or $116.2 \pm 1.7\%$, $n = 7$) were not significantly different (Fig. 4f).

In the presence of extracellular TEA (20 mM), the mean resting membrane potential was -52 ± 4 mV ($n = 11$). Ejection of 10 mM EtOH in the vicinity of the cells produced a significant and reversible depolarization to -47 ± 7 mV from a resting potential of -63 ± 6 mV ($n = 7$, Fig. 5a). I_A currents were evoked by 200-ms depolarizing pulses from -80 to +60 mV in the whole-cell configuration with 0.1 mM GTP added in the pipette solution. Ten mM EtOH induced a modest and slowly reversible inhibition of $17 \pm 5\%$ (peak) and $28 \pm 8\%$ (plateau, $n = 11$, Fig. 5b and c) of I_A current amplitude which was reproducible after a second EtOH application (Fig. 5b, upper current traces). Subsequent analysis of the

steady-state voltage-dependent properties of I_A revealed similar half-activated and -inactivated potentials in the absence or presence of EtOH (data not shown). When cells were challenged with GTP γ S (0.1 mM) in the internal solution, EtOH provoked a non-reversible decrease in the I_A current amplitude which appeared even more pronounced after a second EtOH application (Fig. 5b, lower current traces). In the presence of GTP γ S, the inhibitory effect of EtOH (peak, $67.1 \pm 4.7\%$; plateau, $52.7 \pm 10.0\%$, $n = 5$) was significantly accentuated (Fig. 5c).

In order to correlate the dose-effect of EtOH on cell membrane depolarization (Fig. 1a) with neuroprotective and/or neurotoxic effect of EtOH, cerebellar granule cells were exposed to graded concentrations of EtOH (Fig. 6a). After 7 DIV, a 18-h incubation period of granule cells with EtOH provoked a biphasic dose-dependent modulation of granule cell survival. The calcine acetoxy methyl ester and propidium iodide probes were used to visualize the viability of granule cells after EtOH treatment (Fig. 6a). The neurotoxic effect of 400 mM EtOH was associated with modifications of granule cell morphology (cell shrinkage) that were suggestive of apoptotic cell death. However, as shown on microphotographs, numerous remaining cells in the 400 mM EtOH-treated condition were still surviving. Survival quantification showed that EtOH (10–50 mM) induced a significant increase of cell viability by around 20%, whereas high EtOH concentration decreased the proportion of surviving cells to $87.87 \pm 1.3\%$ (200 mM) and $74.9 \pm 2.2\%$ (400 mM; Fig. 6a). Low concentrations of the K⁺ channel blockers TEA (1–5 mM)

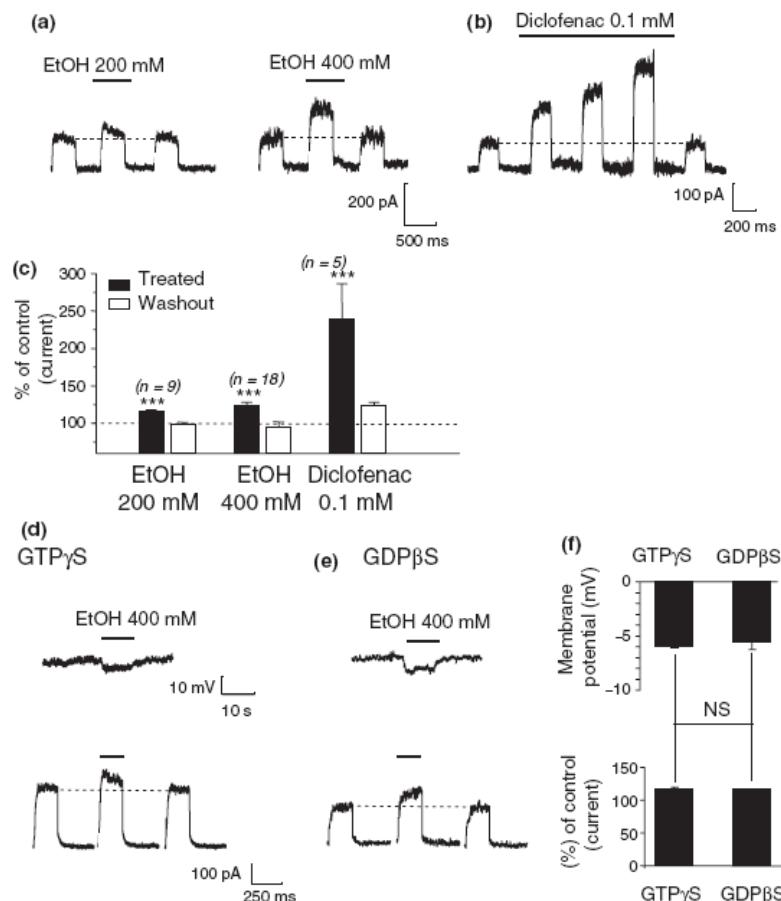


Fig. 4 Effects of EtOH and diclofenac on the voltage-delayed rectifier current (I_K) in rat cerebellar granule cells. The fast-inactivating K^+ current (I_A) was blocked by 4-AP (5 mM) when applied in the bath solution. (a) Consecutive traces of I_K currents were evoked by sequential 200-ms depolarizing pulses from -50 mV to $+50$ mV at 15-s intervals, before, during, and after 200 mM (left) or 400 mM (right) EtOH (horizontal bars). (b) Consecutive I_K currents recorded at 15-s intervals before, during (60-s, horizontal bar), and after 0.1 mM diclofenac perfusion. (c) Quantification of the EtOH- or diclofenac-induced I_K stimulation. (d) Hyperpolarizations (upper traces) and I_K current

stimulations (bottom traces) provoked by a 15-s ejection (horizontal bars) of EtOH (400 mM) in the presence of GTP γ S (0.1 mM) in the pipette solution. (e) Hyperpolarizations (upper traces) and I_K current stimulations (bottom traces) provoked by a 15-s ejection (horizontal bars) of EtOH (400 mM) in the presence of GDP β S (0.1 mM) in the pipette solution. (f) Quantification of the EtOH-induced membrane hyperpolarization and activation of I_K currents recorded in the presence of GTP γ S or GDP β S. The data represent the mean values (\pm SEM) obtained from 3 to 18 cells. *** $p < 0.001$ versus mean membrane potential or control current before EtOH application. ns, non-significant.

and 4-AP (1 mM) significantly favored cell viability whereas increasing the channel blocker concentrations evoked pro-death responses. Interestingly, exposition to neuroprotective concentrations of TEA (5 mM) and 4-AP (1 mM) did not produce additive surviving effects, and 4-AP (1 mM) failed to attenuate and even worsened the TEA (20 mM)-induced cell death [TEA (20 mM), $62 \pm 7\%$; TEA (20 mM) + 4-AP (1 mM), $36.1 \pm 3.7\%$, Fig. 6b]. In the same way, the increase in cell survival evoked by EtOH (10 mM) was non-additive with the prosurvival effect of TEA (5 mM), and abolished by the I_A channel blocker 4-AP (1 mM; Fig. 6c). As shown in

Fig. 6c, neither TEA (5 mM) nor 4-AP (1 mM) prevented EtOH-induced (400 mM) neurotoxicity.

Discussion

The cerebellum is one of brain areas that is most sensitive to EtOH effects during development, with loss of both Purkinje and granule neurons (Servais *et al.* 2007). Thus, a better understanding of the mechanisms that are involved in this neuronal vulnerability to alcohol appears to be of paramount importance. Using cultured cerebellar granule cells and patch-clamp recordings, we demonstrated in this study that

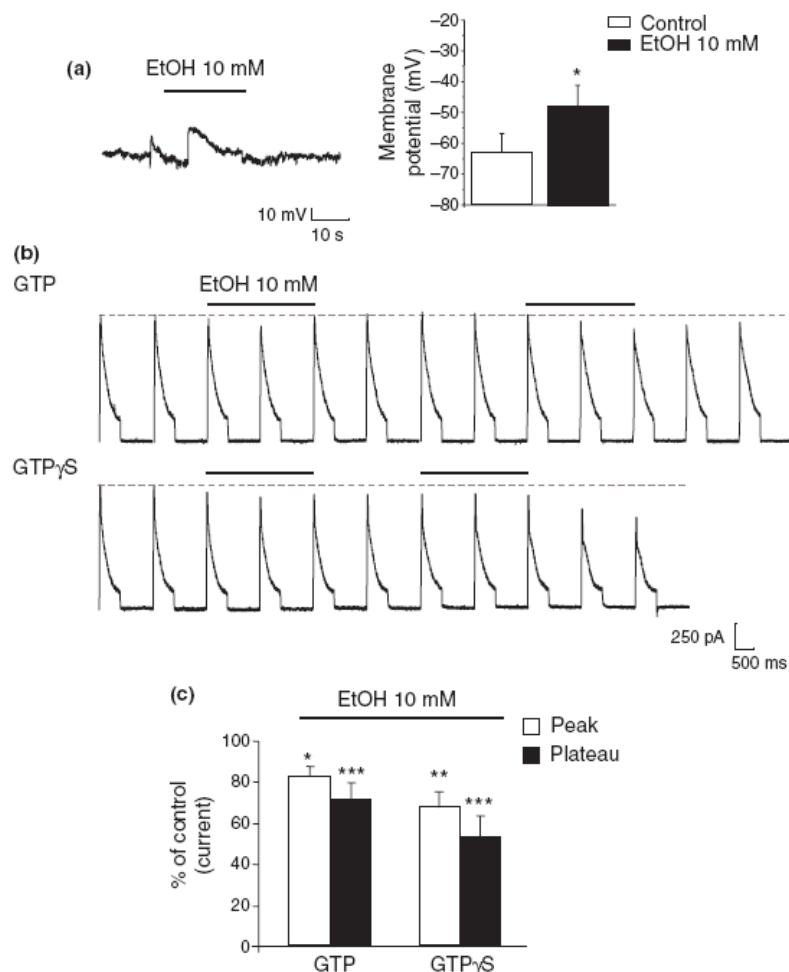


Fig. 5 Effect of EtOH on the fast-inactivating I_A current in rat cerebellar granule cells. The delayed non-inactivating K⁺ current (I_K) was blocked by TEA (20 mM) when applied in the bath solution. (a) Left: voltage recordings of the effect of a 15-s ejection (horizontal bar) of 10 mM EtOH in a GTP-dialyzed cell. Right: quantification of the EtOH-induced membrane depolarization. The data represent the mean values (\pm SEM) obtained from seven cells. (b) I_A currents evoked by sequential 200-ms depolarizing pulses from -80 to +60 mV at 15-s intervals before,

during (30 s, horizontal bar), and after two consecutive EtOH (10 mM) ejections in the presence of GTP (0.1 mM, upper current traces) or GTP γ S (0.1 mM, bottom current traces) in the pipette solution. (c) Quantification of the effect of EtOH on I_A measured at the beginning (peak) or the end (plateau) of the pulse protocol in GTP- or GTP γ S-dialyzed cells. The data represent the mean values (\pm SEM) obtained from 5 to 11 cells. * p < 0.05; ** p < 0.05; *** p < 0.001 versus mean resting membrane potential or control current before EtOH application.

EtOH provoked a concentration-dependent dual modulation of 5–10 DIV cerebellar granule cell electrical activity, underlying changes in membrane ionic currents and cell survival.

Dual modulation of the global membrane potential and current by EtOH

A number of *in vivo* and *in vitro* studies reports that neurons are less susceptible to apoptotic mechanisms in a membrane activity-dependent manner (Ikonomidou *et al.* 1999; Monti and Contestabile 2000). In particular, cerebellar granule cells at 5–10 DIV cultured in the presence of serum and

depolarizing 25 mM KCl developed characteristics of mature cerebellar granule cells, including an extensive neuritic network, expression of excitatory amino acid receptors, and production and release of L-glutamate (Burgoine *et al.* 1993). Here, we observed that EtOH from 10 to 50 mM, significantly increased the depolarizing state of the cells by lowering the resting membrane potential. In contrast, treatment of granule cells with EtOH concentrations above 100 mM induced cell hyperpolarization, stabilizing the resting membrane potential at more negative values. In response to hyperpolarizing and depolarizing current injections, EtOH evoked a modest increase and decrease in the

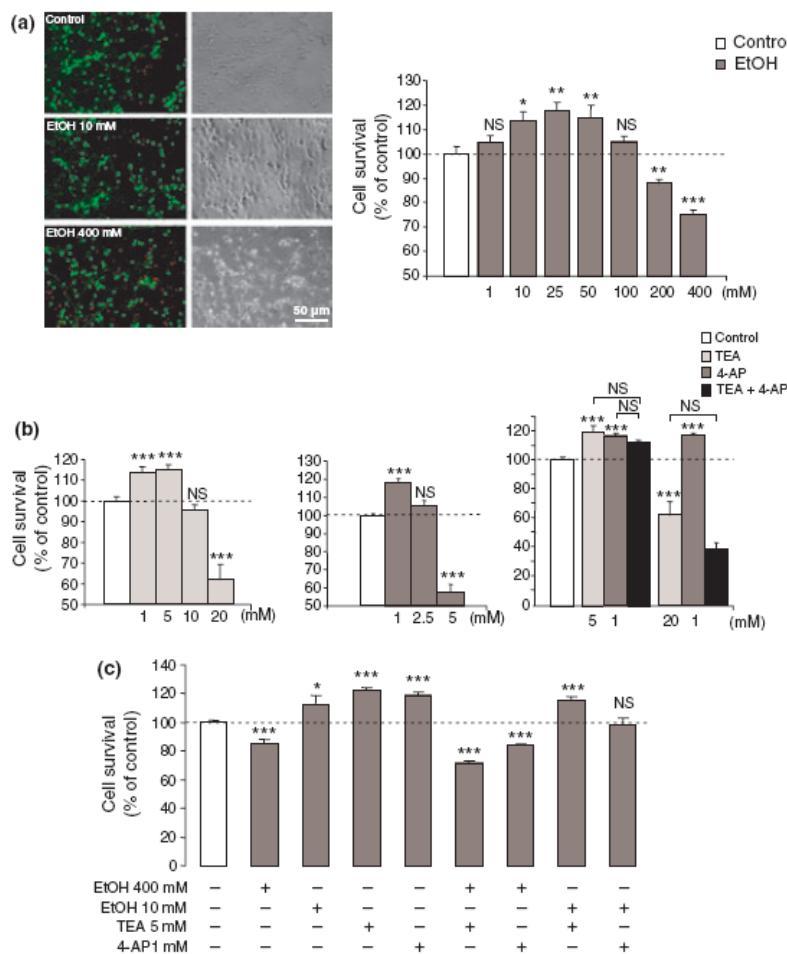


Fig. 6 Effect of EtOH and K^+ channel blockers on rat cerebellar granule cell survival. Cell survival was quantified on 7 DIV granule cells after 18 h of treatment in the absence of serum and in 5 mM potassium. (a) Left: typical microphotographs of granule cells cultured in control conditions or in the presence of EtOH (10, 400 mM). Living cells were labeled with calcein (green fluorescence), and dead cells were labeled with propidium iodide (red fluorescence). Right: effects of graded concentrations of EtOH on survival of cultured granule cells. (b) Effects of different concentrations of TEA (left), 4-AP (middle), or combinations of TEA and 4-AP (right) on granule cell survival. (c) Effects of exposure to EtOH (10 and 400 mM) in the absence or presence of TEA (5 mM) or 4-AP (1 mM). The data represent the mean values (\pm SEM) of three to nine independent experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus Control. ns, non-significant.

input resistance at 10 and 400 mM, respectively. Thus EtOH effects on cell input resistance may be likely to account for by modulation of functional channels that were active around cell resting potential, i.e., Na^+ and K^+ current channels (Mellor et al. 1998).

In the voltage-clamp mode of the patch-clamp technique, depolarizing potentials (-80 to +50 mV) were applied to record fast inward currents and outward K^+ currents evoked by cerebellar granule cells. As reported previously, outward K^+ currents predominated and could be divided in a slowly inactivating and a fast-inactivating components, attributable to a delayed rectifier I_K and A-type I_A K^+ currents, respectively (Wakazono et al. 1997; Shibata et al. 2000; Mei et al. 2004). Outward K^+ current amplitudes were decreased by EtOH (10 mM) or increased by EtOH (400 mM), suggesting differential modulation of K^+ currents expressed by granule neurons. These data prompted us to investigate the participation of I_K and I_A in the EtOH-induced modulation of K^+ conductances. In the presence of the I_A and I_K specific blockers, we observed that I_K activation arose

from -40 mV, slowly increasing with depolarized potentials whereas I_A developed from the subthreshold potential of -60 mV and progressively inactivated from 0 mV. EtOH at low concentration diminished a persistent outward K^+ current activated at membrane potentials positive to -60 mV and, at high concentration, increased the amplitude of the current activated only from positive potentials, suggesting that EtOH specifically depresses I_A current at low concentration and additionally potentiates I_K at acute concentration.

I_K current channel and EtOH high concentrations

Given that the delayed rectifier channel represented 60% and the fast-inactivating current comprised more than 40%, any contribution of these were investigated in the low and high concentration-induced modulation of K^+ channels activities by EtOH. In this study we observed that under sustained blockage of Na^+ current channels by TTX and I_A current channels by 4-AP, short EtOH (400 mM) ejections induced hyperpolarization and outward current in cerebellar granule cells. The V/V and I/V curves showed that EtOH effects

(i) occurred from potentials positive to -80 mV, (ii) were especially pronounced at a threshold potential of -40 mV, and (iii) failed to change the reversal potential or to induce any rectification of the I/V relationship. As determined from analysis of the activation and inactivation curves, EtOH mainly shifted the half-activated conductance value towards more negative potentials (Supporting Information), rendering the I_K channels more activable at resting potentials, an event that is likely to alter resting membrane excitability. These findings indicate that EtOH activates K⁺ currents without altering the ion conduction within the channel pore. Similar effects of EtOH have been described on Ca²⁺-dependent K⁺ channels in rat neurohypophysial nerve terminals (Dopico *et al.* 1996) and rat dorsal root ganglia (Gruß *et al.* 2001). The other characteristic of the I_K amplitude increase evoked by EtOH (200 mM) was the fast and readily reversible action. Recent studies revealed that a K⁺ channel opener, diclofenac, directly opened a slowly activating K⁺ current channel in murine B-16 melanoma cells (Liu *et al.* 2004) and the fast-inactivating K⁺ current channel in cerebellar granule cells (Liu *et al.* 2005), whereas some of its effects were specifically inhibited by voltage-dependent and BK channel blockers in neurons (Ortiz *et al.* 2002). In the same way, we observed that diclofenac markedly stimulated I_K opening, a process also readily reversible. Consequently, the leftward shift of the I_K activation characteristics and the rapid and readily open channel-like effects of EtOH high concentrations strongly suggest modifications of the channel gating properties. Accordingly, when G-proteins were maintained irreversibly active or inactive by the non-hydrolyzable analogs, GTP γ S or GDP β S, in the patch pipette solution, respectively, activation of I_K channels was unchanged. As these effects were observed under conditions that excluded secondary G protein modulation, it is very unlikely that delayed rectifier channel activation is mediated via G-protein coupled receptors. Thus, the EtOH-evoked I_K potentiation should result from modification of I_K channel gating such as changes in the unitary conductance, the open probability and/or the length of openings/closures of the channel. In support of these hypothesis, Dopico *et al.* (1996) have demonstrated the involvement of an increase in the open probability without modification of the unitary conductance, resulting from drug-induced modifications of channel-gating properties in neurohypophysial terminals. Collectively, some lines of evidence narrows the possibilities of action of EtOH to entities located in, or tightly associated with the channel protein itself on sites that share common structural features among I_K and B_K channels.

I_A current channel and EtOH low concentration

The current results revealed that EtOH at relevant low concentration (10 mM) induced granule cell depolarization when I_K current was specifically inhibited by TEA. Moreover, EtOH (10 mM) reversibly reduced the I_A amplitude

evoked by depolarizing steps from -80 to $+50$ mV, without affecting the open state I/V relationship. Our observations indicated that the effect of EtOH on I_A did not interfere with the activation kinetics and the gating properties of the fast-inactivating K⁺ current. Interestingly, we observed that the inhibition of I_A by EtOH (10 mM) was irreversibly prolonged when GTP γ S was dialyzed in the intracellular compartment. It suggests the existence of a functional coupling between EtOH-mediating regulation of I_A and a G protein, excluding a potential direct interaction with the channel gate. Different studies reported that EtOH would mediate effects through receptors and second messenger systems. For instance, it has been shown that EtOH acutely increases intracellular cAMP content in brain (Tabakoff and Hoffman 1998), potentiates, and desensitizes receptor-stimulated cAMP production via G α_s (Diamond and Gordon 1997). Interestingly, a recent study in adult olfactory neurons demonstrated that activation of protein kinase C, a downstream effector of the phospholipase C pathway, mimicked the reduction of I_A by PACAP whereas elevating cAMP by a membrane permeant analog had no effect (Han and Lucero 2005). As no specific receptor for EtOH has been identified so far, EtOH may decrease I_A via an unknown mechanism, leading to the activation of intracellular signaling cascades that is likely to recruit a protein kinase C in granule cells.

EtOH-induced modulation of K⁺ currents and cell survival

In cultured cerebellar granule neurons, EtOH either causes enhanced cell loss when administered alone or reverses the trophic action of low glutamate concentrations (Bhave and Hoffman 1997; Castoldi *et al.* 1998; Vaudry *et al.* 2002). Different classes of ion channels can positively or negatively affect cell survival (Blondeau *et al.* 2000; Krick *et al.* 2001; Xia *et al.* 2002). In particular, potassium channels play important roles in apoptosis and perturbation of K⁺ concentration markedly affects caspase activation (Remillard and Yuan 2004). We have previously reported that PACAP prevented the neurotoxic effects of EtOH on granule neurons, at least in part, via I_K current channel regulation (Mei *et al.* 2004). In the present study, exposure of 7-DIV granule neurons to graded concentrations of EtOH provoked a biphasic modulation of cell survival, i.e., a neurotrophic effect between 10 and 50 mM and a weak pro-death effect at 200 and 400 mM. This low toxicity does not appear to be surprising, considering that EtOH-mediated cell death is only manifested when the EtOH exposure occurs at specific developmental times (Hamre and West 1993). Indeed, addition of EtOH to freshly isolated cerebellar granule cells was reported to markedly increase cell loss (Pantazis *et al.* 1993; Luo *et al.* 1997) whereas the vulnerability of granule cells to the neurotoxic action of EtOH was reported to diminish with time in culture, a 24-h treatment of 7–8 DIV cells in culture failing to alter granule cell survival (Pantazis *et al.* 1993). Here we also showed a biphasic effect of K⁺

channel blockers, TEA and 4-AP; neuroprotective at low concentrations and neurotoxic at high concentrations, suggesting that both I_K and I_A channels are involved in 7-DIV granule cell death/survival. Among the several types of K^+ channels, I_K channels are believed to play important roles in apoptosis because of their highly sustained K^+ conductance (Yu *et al.* 1997; Ramsden *et al.* 2001). The role of I_A in neuron apoptosis is less clear but it has been demonstrated that 4-AP enhances cerebellar granule cell viability and inhibits cytochrome *c* release and caspase 3 activity (Hu *et al.* 2006).

The comparison of our electrophysiological and survival data indicated that when EtOH (10 mM) depolarized granule neurons and promoted cell survival. On the contrary, when alcohol (400 mM) hyperpolarized granule cells, it favored granule cell death. In the same way, previous studies have shown that a high KCl concentration (depolarizing condition) promoted granule cell survival while a low KCl level induced granule cell death (Gallo *et al.* 1987). Taken together, these data suggest an ‘optimal depolarization’ window which favors granule cell survival. In agreement with this hypothesis, it has been shown that low concentrations of glutamate or NMDA were neuroprotective when granule cells were cultured in non-depolarizing conditions (Balázs *et al.* 1988; Bazán-Peregrino *et al.* 2007) while they became neurotoxic in depolarizing conditions (Babot *et al.* 2005). Here, we observed that low depolarizing concentrations of TEA (5 mM) or 4-AP (1 mM) were neurotrophic. In contrast, increasing the depolarizing state by increasing blocker concentrations or co-incubating I_K and I_A blockers resulted in decreasing survival or even in a shift from survival to death. Consistent with this hypothesis, our results showed that the K^+ channel blockers 4-AP (1 mM) and TEA (1–5 mM) administered alone mimicked the protective effect of 10 mM EtOH. However, co-incubation of EtOH (10 mM) and TEA (5 mM) did not allow better survival compared with the individual effects of TEA or EtOH, and the neurotrophic effect of 4-AP (1 mM) was not maintained in the presence of 10 mM EtOH. Thus, we could hypothesize that the trophic effect of 4-AP (1 mM) was associated with a partial blockade of I_A , and that application of EtOH (10 mM) shifted the membrane potential outside the ‘optimal depolarization’ window leading to tip the life/death balance in favor to death.

Our data also revealed that TEA, as 4-AP, failed to counteract the neurotoxic effect of EtOH at 400 mM. This data might be explained through two different hypothesis. First, the existence of a competition between EtOH and TEA within the I_K channel complex has already been proposed. It was established that EtOH entered the channel vestibule, when the latter was in the open conformational state, to link a cavity closed to the binding sites of K^+ ions (Zhou *et al.* 2001). Studies on K^+ channels belonging to the same family of I_K revealed the existence of a binding site for n-alkanols in

an hydrophobic pocket, localized deeply inside the channel pore (Shahidullah *et al.* 2003). As we also observed that EtOH modified I_K gating properties we can suppose that EtOH will provoke I_K current activation in cerebellar granule cells through interaction with a binding site, close to that of TEA. Second, it might be also hypothesized that EtOH also mediated pro-death responses through intracellular mechanisms that did not involve K^+ channels. This hypothesis can be supported by the recent evidence that EtOH destabilizes F-actin polymerization in primary cultured cerebellar neurons (Popp and Dertien 2008) that would be responsible for regulation of a number of targets including NMDA receptor involved in cell apoptosis.

Physiological relevance of *in vitro* alcohol effects on K^+ channels

Several publications indicate that modifications of K^+ channel activities regulate the life/death decision of different cell types including cerebellar granule neurons (Elinder *et al.* 2005; Hu *et al.* 2006). In the present study, the effect of alcohol on cultured granule cells was tested at various concentrations ranging from 1 to 400 mM. Even if the highest alcohol level tested is never reached *in vivo* (blood alcohol concentrations typically observed in moderate-to-heavy drinkers are contained between 50 and 400 mg/dL), our data suggest that modifications of potassium channel conductance by alcohol may participate in the deleterious action of prenatal alcohol exposure on brain development. Consistent with this hypothesis, it has been recently shown that inhibition of Two-pore domain Acid-Sensitive K^+ channels (TASK channels) during gestation reduced the alcohol-induced injury in the cerebellum (Ramadoss *et al.* 2008).

Although the exact mechanism by which EtOH exerted its effect in the developing brain is still a matter of debate, numerous studies showed that EtOH could durably affect different ligand-gated ion channels of several neurotransmitter systems including GABA and glutamate (Samudio-Ruiz *et al.* 2009). Taken together, these data suggest that the effect of alcohol on K^+ channels may contribute to modify the electrical properties, and consequently, the life/death balance of neuronal cells (Lovinger *et al.* 1990; Li *et al.* 1994).

In conclusion, we demonstrated that K^+ channel modulation of granule cells by EtOH consisted of two distinct components, the reversible and rapid activation of I_K current channels by high EtOH concentrations and the inhibition of the A-type I_A current by low EtOH doses. The molecular mechanism of this dual effect is not yet clear but appears to be mediated through two independent processes. Thus, channel modulation by EtOH alters electroresponsiveness and intracellular K^+ homeostasis of granule cells which may lead to neuronal growth, survival or death, and consequently can modify the intrinsic capability of these neurons to mediate excitatory inputs.

Acknowledgments

This work was supported by Inserm (U413), the Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB, Grant no.: 2005/31), the University of Rouen and the Conseil régional de Haute-Normandie. TL is a recipient of a fellowship from Inserm and the Conseil Régional de Haute-Normandie. NA is a recipient of a fellowship from the Centre International de Toxicologie and the Conseil Régional de Haute Normandie.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Effect of repeated administrations of 200 mM EtOH on the delayed outward K⁺ current (I_K) in cultured rat cerebellar granule cells.

Table S1. Effects of EtOH on the functional properties of the I_K current component in cerebellar granule cells.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

References

- Appel S. B., Liu Z., McElvain M. A. and Brodie M. S. (2003) Ethanol excitation of dopaminergic ventral tegmental area neurons is blocked by quinidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 437–446.
- Babot Z., Cristófol R. and Suñol C. (2005) Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABA_A receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 103–112.
- Balázs R., Gallo V. and Kingsbury A. (1988) Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture. *Brain Res.* **468**, 269–276.
- Bazán-Peregrino M., Gutiérrez-Kobeh L. and Morán J. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in the protective action of N-methyl-D-aspartate in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by low potassium. *J. Neurosci. Res.* **85**, 332–341.
- Bhave S. V. and Hoffman P. L. (1997) Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *J. Neurochem.* **68**, 578–586.
- Blondeau N., Plamondon H., Richelme C., Heurteaux C. and Lazdunski M. (2000) K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* **100**, 465–474.
- Bonthius D. J., Karacay B., Dai D., Hutton A. and Pantazis N. J. (2004) The NO-cGMP-PKG pathway plays an essential role in the acquisition of ethanol resistance by cerebellar granule neurons. *Neurotoxicol. Teratol.* **26**, 47–57.
- Brevnova E. E., Platoshyn O., Zhang S. and Yuan J. X. (2004) Over-expression of human KCNA5 increases IKV and enhances apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, 715–722.
- Brodie M. S., Scholz A., Weiger T. M. and Dopico A. M. (2007) Ethanol interactions with calcium-dependent potassium channels. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **31**, 1625–1632.
- Burgoine R. D., Graham M. E. and Cambray-Deakin M. (1993) Neurotrophic effects of NMDA receptor activation on developing cerebellar granule cells. *J. Neurocytol.* **22**, 689–695.
- Castoldi A. F., Barni S., Randine G., Costa L. G. and Manzo L. (1998) Ethanol selectively interferes with the trophic action of NMDA and carbachol on cultured cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Brain Res. Dev.* **111**, 279–289.
- Chen J. C., Lin C. C., Ng C. C., Chiu T. F. and Shyr M. H. (2007) Uneven distribution of ethanol in rat brain following acute administration, with the highest level in the striatum. *J. Stud. Alcohol Drugs* **68**, 649–653.
- Covarrubias M., Vyas T. B., Escobar L. and Wei A. (1995) Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. Insights into the molecular basis of general anesthesia. *J. Biol. Chem.* **270**, 19408–19416.
- Diamond I. and Gordon A. S. (1997) Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* **77**, 1–20.
- Dopico A. M., Lemos J. R. and Treistman S. N. (1996) Ethanol increases the activity of large conductance, Ca(2+)-activated K⁺ channels in isolated neurohypophyseal terminals. *Mol. Pharmacol.* **49**, 40–48.
- Elinder F., Akanda N., Tofighi R., Shimizu S., Tsujimoto Y., Orrenius S. and Ceccatelli S. (2005) Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis induced by toxic stimuli. *Cell Death Differ.* **12**, 1134–1140.
- Elliott J. I. and Higgins C. F. (2003) IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep.* **4**, 189–194.
- Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O. S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**, 2203–2213.
- Gonzalez B., Leroux P., Lamacz M., Bodenaut C., Balazs R. and Vaudry H. (1992) Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**, 9627–9631.
- Goodlett C. R. and Horn K. H. (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res. Health* **25**, 175–184.
- Goodlett C. R., Pearlman A. D. and Lundahl K. R. (1998) Binge neonatal alcohol intubations induce dose-dependent loss of Purkinje cells. *Neurotoxicol. Teratol.* **20**, 285–292.
- Gruß M., Henrich M., Konig P., Hempelmann G., Vogel W. and Scholz A. (2001) Ethanol reduces excitability in a subgroup of primary sensory neurons by activation of BK(Ca) channels. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1246–1256.
- Hamre K. M. and West J. R. (1993) The effects of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 610–622.
- Han P. and Lucero M. T. (2005) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide reduces A-type K⁺ currents and caspase activity in cultured adult mouse olfactory neurons. *Neuroscience* **134**, 745–756.
- Hatten M. E. and Heintz N. (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 385–408.
- Hoyme H. E., May P. A., Kalberg W. O. et al. (2005) A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatrics* **115**, 39–47.
- Hu C. L., Liu Z., Zeng X. M., Liu Z. Q., Chen X. H., Zhang Z. H. and Mei Y. A. (2006) 4-aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology* **51**, 737–746.

- Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova T. I., Stefovka V., Turski L. and Olney J. W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* **283**, 70–74.
- Ikonomidou C., Bittigau P., Ishimaru M. J. et al. (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* **287**, 1056–1060.
- Jiang Y., Kumada T., Cameron D. B. and Komuro H. (2008) Cerebellar granule cell migration and the effects of alcohol. *Dev. Neurosci.* **30**, 7–23.
- Krick S., Platoshyn O., Sweeney M., Kim H. and Yuan J. X. (2001) Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, 970–979.
- Lewohl J. M., Wilson W. R., Mayfield R. D., Brozowski S. J., Morrisett R. A. and Harris R. A. (1999) G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nat. Neurosci.* **2**, 1084–1090.
- Li C., Peoples R. W. and Weight F. F. (1994) Alcohol action on a neuronal membrane receptor: evidence for a direct interaction with the receptor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 8200–8204.
- Liu L. Y., Hu C. L., Ma L. J., Zhang Z. H. and Mei Y. A. (2004) ET-1 inhibits B-16 murine melanoma cell migration by decreasing K(+) currents. *Cell Motil. Cytoskeleton* **58**, 127–136.
- Liu L. Y., Fei X. W., Li Z. M., Zhang Z. H. and Mei Y. A. (2005) Diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, activates the transient outward K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **48**, 918–926.
- Lovinger D. M., White G. and Weight F. F. (1990) NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J. Neurosci.* **10**, 41372–41379.
- Luo J., West J. R. and Pantazis N. J. (1997) Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21**, 1108–1120.
- Mathie A., Clarke C. E., Ranatunga K. M. and Veale E. L. (2003) What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum* **2**, 11–25.
- Mattson S. N. and Riley E. P. (1998) A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 279–294.
- Mei Y. A., Vaudry D., Basille M., Castel H., Fournier A., Vaudry H. and Gonzalez B. J. (2004) PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of Ik in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1446–1458.
- Mellor J. R., Merlo D., Jones A., Wisden W. and Randall A. D. (1998) Mouse cerebellar granule cell differentiation: electrical activity regulates the GABA_A receptor alpha 6 subunit gene. *J. Neurosci.* **18**, 2822–2833.
- Monti B. and Contestabile A. (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 3117–3123.
- Oberdoerster J. and Rabin R. A. (1999) Enhanced caspase activity during ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Eur. J. Pharmacol.* **385**, 273–282.
- Orlov S. N., Pchelitski D., Taurin S., Thorin-Trescases N., Maximov G. V., Pshezhetsky A. V., Rubin A. B. and Hamet P. (2004) Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism. *Apoptosis* **9**, 55–66.
- Ortiz M. I., Torres-Lopez J. E., Castaneda-Hernandez G., Rosas R., Vidal-Cantu G. C. and Granados-Soto V. (2002) Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. *Eur. J. Pharmacol.* **438**, 85–91.
- Pal S., Hartnett K. A., Nerbonne J. M., Levitan E. S. and Aizenman E. (2003) Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J. Neurosci.* **23**, 4798–4802.
- Pantazis N. J., Dohrman D. P., Goodlett C. R., Cook R. T. and West J. R. (1993) Vulnerability of cerebellar granule cells to alcohol-induced cell death diminishes with time in culture. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17**, 1014–1021.
- Popp R. L. and Dertien J. S. (2008) Actin depolymerization contributes to ethanol inhibition of NMDA receptors in primary cultured cerebellar granule cells. *Alcohol* **42**, 525–539.
- Ramadoss J., Lunde E. R., Ouyang N., Chen W. J. and Cudd T. A. (2008) Acid-sensitive channel inhibition prevents fetal alcohol spectrum disorders cerebellar Purkinje cell loss. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R596–603.
- Ramsden M., Plant L. D., Webster N. J., Vaughan P. F., Henderson Z. and Pearson H. A. (2001) Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1–40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J. Neurochem.* **79**, 699–712.
- Remillard C. V. and Yuan J. X. (2004) Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, 49–67.
- Ren H., Honse Y., Karp B. J., Lipsky R. H. and Peoples R. W. (2003) A site in the fourth membrane-associated domain of the N-methyl-D-aspartate receptor regulates desensitization and ion channel gating. *J. Biol. Chem.* **278**, 276–283.
- Samudio-Ruiz S. L., Allan A. M., Fernando Valenzuela C., Perrone-Bizzozero N. I. and Caldwell K. K. (2009) Prenatal ethanol exposure persistently impairs N-methyl-D-aspartate receptor-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase in the mouse dentate gyrus. *J. Neurochem.* **5**, 1311–1323.
- Servais L., Hourez R., Bearzatto B., Gall D., Schiffmann S. N. and Cheron G. (2007) Purkinje cell dysfunction and alteration of long-term synaptic plasticity in fetal alcohol syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 9858–9863.
- Shahidullah M., Harris T., Germann M. W. and Covarrubias M. (2003) Molecular features of an alcohol binding site in a neuronal potassium channel. *Biochemistry* **42**, 11243–11252.
- Shibata R., Nakahira K., Shibusaki K., Wakazono Y., Imoto K. and Ikenaka K. (2000) A-type K⁺ current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **20**, 4145–4155.
- Tabakoff B. and Hoffman P. L. (1998) Adenylyl cyclases and alcohol. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **32**, 173–193.
- Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Pamantung T. F., Fontaine M., Fournier A. and Vaudry H. (2000) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/CPP32. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 13390–13395.
- Vaudry D., Rousselle C., Basille M., Falluel-Morel A., Pamantung T. F., Fontaine M., Fournier A., Vaudry H. and Gonzalez B. J. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 6398–6403.
- Wakazono Y., Kurahashi T., Nakahira K., Nagata I., Takayama C., Inoue Y., Kaneko A. and Ikenaka K. (1997) Appearance of a fast inactivating voltage-dependent K⁺ currents in developing cerebellar granule cells *in vitro*. *Neurosci. Res.* **29**, 291–301.
- Wang Y. H., Bosy T. Z., Yasuda R. P., Grayson D. R., Vicini S., Pizzorusso T. and Wolfe B. B. (1995) Characterization of NMDA receptor subunit-specific antibodies: distribution of NR2A and

- NR2B receptor subunits in rat brain and ontogenetic profile in the cerebellum. *J. Neurochem.* **65**, 176–183.
- Watkins C. S. and Mathie A. (1996) A non-inactivating K⁺ current sensitive to muscarinic receptor activation in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* **491**, 401–412.
- Xia S., Lampe P. A., Deshmukh M., Yang A., Brown B. S., Rothman S. M., Johnson E. M. and Yu S. P. Jr (2002) Multiple channel interactions explain the protection of sympathetic neurons from apoptosis induced by nerve growth factor deprivation. *J. Neurosci.* **22**, 114–122.
- Yu S. P. (2003) Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* **70**, 363–386.
- Yu S. P., Yeh C. H., Sensi S. L., Gwag B. J., Canzoniero L. M., Farhangrazi Z. S., Ying H. S., Tian M., Dugan L. L. and Choi D. W. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* **278**, 114–117.
- Zheng T. M., Zhu W. J., Puia G., Vicini S., Grayson D. R., Costa E. and Caruncho H. J. (1994) Changes in gamma-aminobutyrate type A receptor subunit mRNAs, translation product expression, and receptor function during neuronal maturation in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 10952–10956.
- Zhong J., Yang X., Yao W. and Lee W. (2006) Lithium protects ethanol-induced neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 905–10.
- Zhou M., Morais-Cabral J. H., Mann S. and MacKinnon R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **7**, 657–661.

Additional data

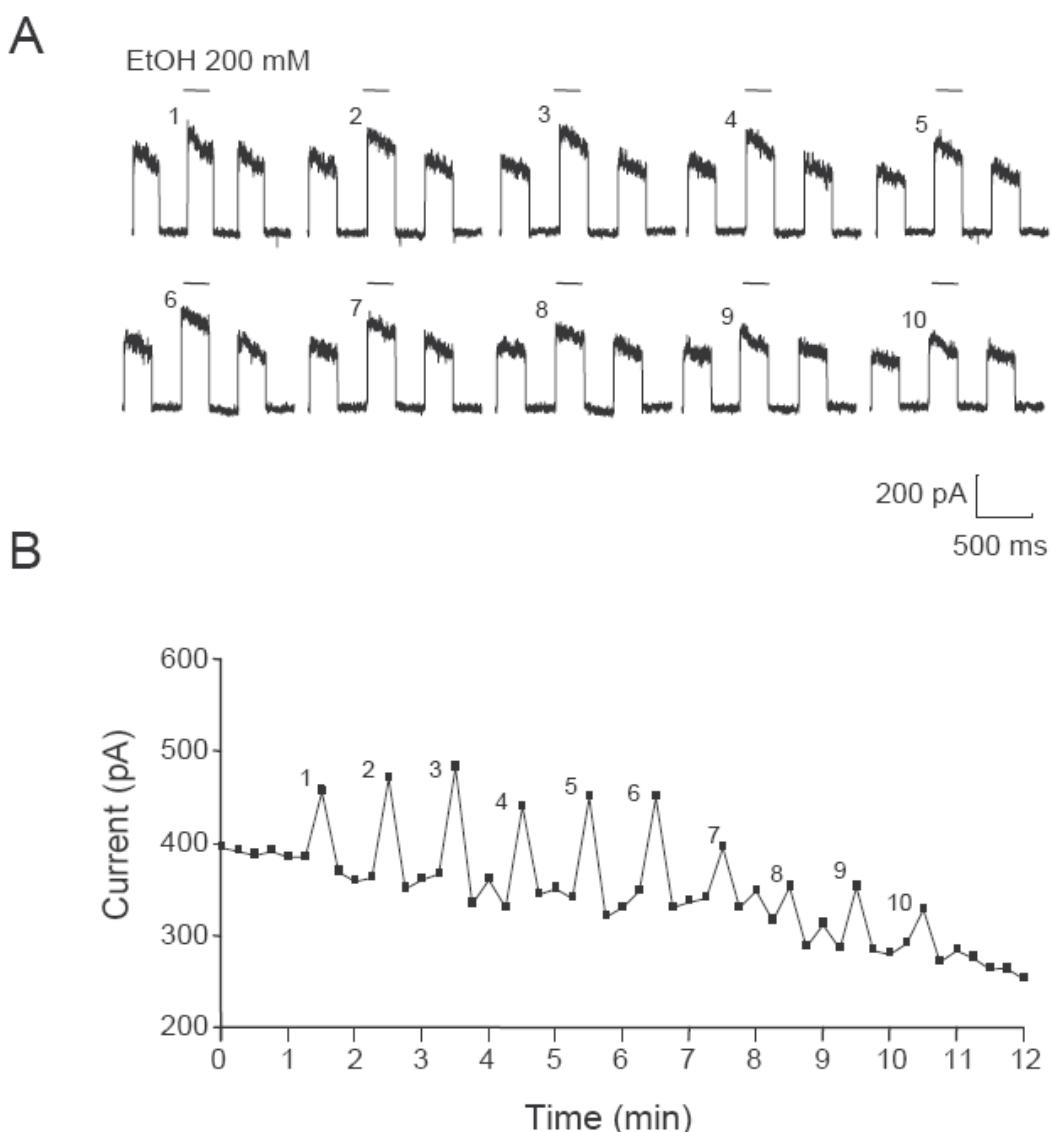


Figure 1. Effect of repeated administrations of EtOH 200 mM on the delayed outward K⁺ current (IK) in cultured rat cerebellar granule cells. (A) Activated K⁺ currents evoked by sequential 200-ms depolarizing pulses from -50 mV to +50 mV, were mainly attributable to IK currents. They were stimulated at 15-s intervals before, during and after EtOH (200 mM) ejection on the same granule cell. (B) Corresponding time course of the EtOH-induced K⁺ current potentiation from the first to the tenth (1-10) ejection of EtOH at 60-s intervals.

Table 1. Effects of EtOH on the functional properties of the I_K current component in cerebellar granule cells

	Control	EtOH 400 mM
Activation curve		
Midpoint V _h	+3.2 ± 0.9 mV	-3.4 ± 0.9 mV (<i>n</i> =6)
Slope factor <i>k</i>	13.9 ± 1.4 mV	14.7 ± 1.4 mV
Inactivation curve		
Midpoint V _h	-72.2 ± 0.7 mV	-75.5 ± 1.0 mV (<i>n</i> =5)
Slope factor <i>k</i>	+6.4 ± 0.9 mV	+9.9 ± 0.5 mV

Table 1. Effects of EtOH on the functional properties of the I_K current component in cerebellar granule cells. The fast inactivating K⁺ current (IA) was blocked by 4-AP (5 mM) applied in the bath solution. Cells were held at -50 mV and depolarized by 10-mV steps from -50 mV to +50 mV. The conductance versus voltage curves were established from currents recorded in the absence or presence of EtOH 400 mM and well fitted by a Boltzmann function. Voltage-dependent steady-state I_K inactivation was recorded in the absence or presence of 400 mM EtOH. The membrane potential was held at -50 mV, and a conditional prepulse to various potentials (between -70 mV to +20 mV) was applied for 200-ms before the pulse to +40 mV. Values indicate mean ± SEM and total number of patches (in parentheses).

Références Bibliographiques



Références bibliographiques –



- Abdelrahman AM and Pang CC (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life Sci* **71**, 819-825.
- Abdel-Razik AE, Forty EJ, Balment RJ and Ashton N (2008) Renal haemodynamic and tubular actions of urotensin II in the rat. *J Endocrinol* **198**, 617-624.
- Adkins CE, Pillai GV, Kerby J, Bonnert TP, Haldon C, McKernan RM, Gonzalez JE, Oades K, Whiting PJ and Simpson PB (2001) alpha4beta3delta GABA(A) receptors characterized by fluorescence resonance energy transfer-derived measurements of membrane potential. *J Biol Chem* **276**, 38934-38939.
- Agrawal V and Kishan KV (2002) Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins. *Protein Pept Lett* **9**, 185-193.
- Aguayo LG, Peoples RW, Yeh HH and Yevenes GE (2002) GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? *Curr Top Med Chem* **2**, 869-885.
- Aissaoui H, Binkert C, Clozel M, Mathys B, Mueller C, Nayler O, *et al.* Actelion Pharmaceuticals Ltd. (assignee). Preparation of 1-(piperazinylalkyl)-3-quinolinylurea derivatives as urotensin II antagonists. *PCT Int Appl.*; 2004a (WO2004099179).
- Aissaoui H, Binkert C, Clozel M, Mathys B, Mueller C, Nayler O, *et al.* Actelion Pharmaceuticals Ltd. (assignee). Preparation of novel piperidine derivatives as urotensin II antagonists. *PCT Int Appl.*; 2004b (WO2004099180).
- Aissaoui H, Binkert C, Clozel M, Mathys B, Mueller C, Nayler O, *et al.* Actelion Pharmaceuticals Ltd. (assignee). Preparation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinyl ureas and related derivatives as urotensin II receptor antagonists. *PCT Int Appl.*; 2002 (WO2002076979).
- Aiyar N, Johns DG, Ao Z, Disa J, Behm DJ, Foley JJ, Buckley PT, Sarau HM, van-der-Keyl HK, Elshourbagy NA and Douglas SA (2005) Cloning and pharmacological characterization of the cat urotensin-II receptor (UT). *Biochem Pharmacol* **69**, 1069-1079.
- Akk G and Steinbach JH (2000) Activation and block of recombinant GABA(A) receptors by

- pentobarbitone: a single-channel study. *Br J Pharmacol* **130**, 249-258.
- Akk G, Bracamontes J and Steinbach JH (2001) Pregnenolone sulfate block of GABA(A) receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the alpha subunit. *J Physiol* **532**, 673-684.
- Akk G and Steinbach JH (2003) Low doses of ethanol and a neuroactive steroid positively interact to modulate rat GABA(A) receptor function. *J Physiol* **546**, 641-646.
- Akk G, Shu HJ, Wang C, Steinbach JH, Zorumski CF, Covey DF and Mennerick S (2005) Neurosteroid access to the GABAA receptor. *J Neurosci* **25**, 11605-11613.
- Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF and Mennerick S (2009) The influence of the membrane on neurosteroid actions at GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology*.
- Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, Spinazzi R, Malendowicz LK, Rossi GP and Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* **17**, 1111-1115.
- Alldred MJ, Mulder-Rosi J, Lingenfelter SE, Chen G and Luscher B (2005) Distinct gamma2 subunit domains mediate clustering and synaptic function of postsynaptic GABAA receptors and gephyrin. *J Neurosci* **25**, 594-603.
- Allgulander C, Bandelow B, Hollander E, Montgomery SA, Nutt DJ, Okasha A, Pollack MH, Stein DJ and Swinson RP (2003) WCA recommendations for the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *CNS Spectr* **8**, 53-61.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ and Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**, 282-286.
- Amico C, Cupello A, Fossati C and Robello M (1998) Involvement of phosphatase activities in the run-down of GABA(A) receptor function in rat cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience* **84**, 529-535.
- Amin J and Weiss DS (1993) GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* **366**, 565-569.
- Amin J, Brooks-Kayal A and Weiss DS (1997) Two tyrosine residues on the alpha subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* **51**, 833-841.
- Angelotti TP and Macdonald RL (1993) Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar

- single-channel properties. *J Neurosci* **13**, 1429-1440.
- Arancibia-Carcamo IL and Kittler JT (2009) Regulation of GABA(A) receptor membrane trafficking and synaptic localization. *Pharmacol Ther* **123**, 17-31.
- Arnold-Reed DE and Balment RJ (1994) Peptide hormones influence in vitro interrenal secretion of cortisol in the trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* **96**, 85-91.
- Atack JR (2003) Anxiolytic compounds acting at the GABA(A) receptor benzodiazepine binding site. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2**, 213-232.
- Atack JR (2005) The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs* **14**, 601-618.
- Atack JR, Pike A, Marshall G, Stanley J, Lincoln R, Cook SM, Lewis RT, Blackaby WP, Goodacre SC, McKernan RM, Dawson GR, Wafford KA and Reynolds DS (2006) The in vivo properties of pagoclone in rat are most likely mediated by 5'-hydroxy pagoclone. *Neuropharmacology* **50**, 677-689.
- Auta J, Winsauer PJ, Faust WB, Lambert P and Moerschbaecher JM (1997) Effects of negative allosteric modulators of gamma-aminobutyric acidA receptors on complex behavioral processes in monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **280**, 316-325.

B

- Backus KH, Arigoni M, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Mohler H and Benson JA (1993) Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor deduced from mutation-induced rectification. *Neuroreport* **5**, 285-288.
- Baer K, Essrich C, Benson JA, Benke D, Bluethmann H, Fritschy JM and Lüscher B (1999) Postsynaptic clustering of gamma-aminobutyric acid type A receptors by the gamma3 subunit in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12860-12865.
- Baghdoyan HA, Lydic R, Callaway CW and Hobson JA (1989) The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. *Neuropsychopharmacology* **2**, 67-79.
- Bai D, Pennefather PS, MacDonald JF and Orser BA (1999) The general anesthetic propofol slows deactivation and desensitization of GABA(A) receptors. *J Neurosci* **19**, 10635-10646.
- Bai M (2004) Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal* **16**, 175-186.
- Bali M and Akabas MH (2004) Defining the propofol binding site location on the GABA_A

- receptor. *Mol Pharmacol* **65**, 68-76.
- Balment RJ, Song W and Ashton N (2005) Urotensin II: ancient hormone with new functions in vertebrate body fluid regulation. *Ann N Y Acad Sci* **1040**, 66-73.
- Barak LS, Oakley RH, Laporte SA and Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 93-98.
- Barila B, Cupello A and Robello M (2001) Modulation by lanthanum ions of gamma-aminobutyric acid(A) receptors of rat cerebellum granule cells in culture: clues on their subunit composition. *Neurosci Lett* **298**, 13-16.
- Barker JL and Ransom BR (1978) Amino acid pharmacology of mammalian central neurones grown in tissue culture. *J Physiol* **280**, 331-354.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN and Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* **50**, 291-313.
- Barton LS, Dodson JW, Gaitanopoulos DE, Girard GR, King BW, McAtee JJ, et al. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2004 (WO2004043917).
- Bateson AN, Lasham A and Darlison MG (1991) gamma-Aminobutyric acidA receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel beta-subunit gene transcript. *J Neurochem* **56**, 1437-1440.
- Baumann SW, Baur R and Sigel E (2001) Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* **276**, 36275-36280.
- Baumann SW, Baur R and Sigel E (2002) Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem* **277**, 46020-46025.
- Baumann SW, Baur R and Sigel E (2003) Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci* **23**, 11158-11166.
- Baur R, Minier F and Sigel E (2006) A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett* **580**, 1616-1620.
- Beck M, Brickley K, Wilkinson HL, Sharma S, Smith M, Chazot PL, Pollard S and Stephenson FA (2002) Identification, molecular cloning, and characterization of a novel GABA(A) receptor-associated protein, GRIF-1. *J Biol Chem* **277**, 30079-30090.
- Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG and Moss SJ (2001) GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are

- regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* **4**, 908-916.
- Behm DJ, Harrison SM, Ao Z, Maniscalco K, Pickering SJ, Grau EV, Woods TN, Coatney RW, Doe CP, Willette RN, Johns DG and Douglas SA (2003) Deletion of the UT receptor gene results in the selective loss of urotensin-II contractile activity in aortae isolated from UT receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* **139**, 464-472.
- Behm DJ, Herold CL, Camarda V, Aiyar NV and Douglas SA (2004a) Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *Eur J Pharmacol* **492**, 113-116.
- Behm DJ, Doe CP, Johns DG, Maniscalco K, Stankus GP, Wibberley A, Willette RN and Douglas SA (2004b) Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 274-280.
- Belelli D, Bolger MB and Gee KW (1989) Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Eur J Pharmacol* **166**, 325-329.
- Belelli D, Lan NC and Gee KW (1990) Anticonvulsant steroids and the GABA/benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex. *Neurosci Biobehav Rev* **14**, 315-322.
- Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Wafford K and Whiting PJ (1997) The interaction of the general anesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11031-11036.
- Belelli D, Pistis M, Peters JA and Lambert JJ (1999) General anaesthetic action at transmitter-gated inhibitory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 496-502.
- Belelli D, Casula A, Ling A and Lambert JJ (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* **43**, 651-661.
- Belelli D and Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **6**, 565-575.
- Bencsits E, Ebert V, Tretter V and Sieghart W (1999) A significant part of native gamma-aminobutyric AcidA receptors containing alpha4 subunits do not contain gamma or delta subunits. *J Biol Chem* **274**, 19613-19616.
- Benes FM and Beretta S (2001) GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* **25**, 1-27.
- Benke D, Fakitsas P, Roggenmoser C, Michel C, Rudolph U and Mohler H (2004) Analysis of the presence and abundance of GABAA receptors containing two different types of alpha subunits in murine brain using point-mutated alpha subunits. *J Biol Chem* **279**, 43654-43660.

- Bennett RT, Jones RD, Morice AH, Smith CF and Cowen ME (2004) Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. *Thorax* **59**, 401-407.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H *et al.* (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53-59.
- Bera AK, Chatav M and Akabas MH (2002) GABA(A) receptor M2-M3 loop secondary structure and changes in accessibility during channel gating. *J Biol Chem* **277**, 43002-43010.
- Berezhnov D, Gravielle MC, Farb DH (2007) Pharmacology of the GABA(A) receptor in *Handbook of Contemporary Neuropharmacology* (Sibley, D., Hanin, I., Kuhar, M., and Skolnick. P., eds.) **1**, 465-568, John Wiley & Sons/Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- Berlind A (1972) Teleost caudal neurosecretory system: release of urotensin II from isolated urophyses. *Gen Comp Endocrinol* **18**, 557-560.
- Bern HA, Pearson D, Larson BA and Nishioka RS (1985) Neurohormones from fish tails: the caudal neurosecretory system. I. "Urophysiology" and the caudal neurosecretory system of fishes. *Recent Prog Horm Res* **41**, 533-552.
- Bianchi MT and Macdonald RL (2001) Mutation of the 9' leucine in the GABA(A) receptor gamma2L subunit produces an apparent decrease in desensitization by stabilizing open states without altering desensitized states. *Neuropharmacology* **41**, 737-744.
- Bianchi MT, Haas KF and Macdonald RL (2001) Structural determinants of fast desensitization and desensitization-deactivation coupling in GABAa receptors. *J Neurosci* **21**, 1127-1136.
- Bianchi MT and Macdonald RL (2003) Neurosteroids shift partial agonist activation of GABA(A) receptor channels from low- to high-efficacy gating patterns. *J Neurosci* **23**, 10934-10943.
- Bie BH and Zhao ZQ (2001) Nitric oxide inhibits GABA-evoked current in dorsal root ganglion neuron via PKG-dependent pathway. *Brain Res Bull* **55**, 335-339.
- Bitran D, Hilvers RJ and Kellogg CK (1991) Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA(A) receptor. *Brain Res* **561**, 157-161.
- Bitran D, Shiekh M and McLeod M (1995) Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA(A) receptors. *J Neuroendocrinol* **7**, 171-

177.

- Blair LA, Levitan ES, Marshall J, Dionne VE and Barnard EA (1988) Single subunits of the GABAA receptor form ion channels with properties of the native receptor. *Science* **242**, 577-579.
- Bloom FE and Iversen LL (1971) Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* **229**, 628-630.
- Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, Pangalos M and Moss SJ (2006) Synaptic GABAA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *Embo J* **25**, 4381-4389.
- Bohm F and Pernow J (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *Br J Pharmacol* **135**, 25-27.
- Boileau AJ, Evers AR, Davis AF and Czajkowski C (1999) Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* **19**, 4847-4854.
- Boileau AJ, Newell JG and Czajkowski C (2002) GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem* **277**, 2931-2937.
- Boileau AJ, Li T, Benkwitz C, Czajkowski C and Pearce RA (2003) Effects of gamma2S subunit incorporation on GABAA receptor macroscopic kinetics. *Neuropharmacology* **44**, 1003-1012.
- Boileau AJ, Pearce RA and Czajkowski C (2005) Tandem subunits effectively constrain GABAA receptor stoichiometry and recapitulate receptor kinetics but are insensitive to GABAA receptor-associated protein. *J Neurosci* **25**, 11219-11230.
- Boivin S, Guilhaudis L, Milazzo I, Oulyadi H, Davoust D and Fournier A (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* **45**, 5993-6002.
- Boivin S, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Fournier A and Davoust D (2008) Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II. *Peptides* **29**, 700-710.
- Bollan K, Robertson LA, Tang H and Connolly CN (2003a) Multiple assembly signals in gamma-aminobutyric acid (type A) receptor subunits combine to drive receptor construction and composition. *Biochem Soc Trans* **31**, 875-879.
- Bollan K, King D, Robertson LA, Brown K, Taylor PM, Moss SJ and Connolly CN (2003b) GABA(A) receptor composition is determined by distinct assembly signals within alpha and beta subunits. *J Biol Chem* **278**, 4747-4755.
- Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L,

- Rigby MR, Sirinathsingji DJ, Brown N, Wafford KA and Whiting PJ (1999) theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9891-9896.
- Booher J and Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**, 97-105.
- Borghese CM, Werner DF, Topf N, Baron NV, Henderson LA, Boehm SL, 2nd, Blednov YA, Saad A, Dai S, Pearce RA, Harris RA, Homanics GE and Harrison NL (2006a) An isoflurane- and alcohol-insensitive mutant GABA(A) receptor alpha(1) subunit with near-normal apparent affinity for GABA: characterization in heterologous systems and production of knockin mice. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 208-218.
- Borghese CM, Storustovu S, Ebert B, Herd MB, Belelli D, Lambert JJ, Marshall G, Wafford KA and Harris RA (2006b) The delta subunit of gamma-aminobutyric acid type A receptors does not confer sensitivity to low concentrations of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1360-1368.
- Bormann J and Clapham DE (1985) gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2168-2172.
- Bormann J, Hamill OP and Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* **385**, 243-286.
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci* **11**, 112-116.
- Bormann J and Kettenmann H (1988) Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9336-9340.
- Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR and White R (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* **130**, 1865-1870.
- Boucard AA, Sauve SS, Guillemette G, Escher E and Leduc R (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem J* **370**, 829-838.
- Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH and Giard A (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* **176**, 117-123.
- Bousette N, Pottinger J, Ramli W, Ohlstein EH, Dhanak D, Douglas SA and Giard A (2006a) Urotensin-II receptor blockade with SB-611812 attenuates cardiac remodeling in experimental ischemic heart disease. *Peptides* **27**, 2919-2926.

- Bousette N, Hu F, Ohlstein EH, Dhanak D, Douglas SA and Giard A (2006b) Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 285-295.
- Bovolin P, Santi MR, Puia G, Costa E and Grayson D (1992) Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9344-9348.
- Bowery NG (1993) GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 109-147.
- Bowery NG and Brown DA (1997) The cloning of GABA(B) receptors. *Nature* **386**, 223-224.
- Bradley CA, Taghibiglou C, Collingridge GL and Wang YT (2008) Mechanisms involved in the reduction of GABA(A) receptor alpha1-subunit expression caused by the epilepsy mutation A322D in the trafficking-competent receptor. *J Biol Chem* **283**, 22043-22050.
- Bradshaw DJ and Simmons MA (1995) gamma-Aminobutyric acidA receptor function is modulated by cyclic GMP. *Brain Res Bull* **37**, 67-72.
- Brailoiu E, Jiang X, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Wang H and Dun NJ (2008) State-dependent calcium mobilization by urotensin-II in cultured human endothelial cells. *Peptides* **29**, 721-726.
- Brandon NJ, Uren JM, Kittler JT, Wang H, Olsen R, Parker PJ and Moss SJ (1999) Subunit-specific association of protein kinase C and the receptor for activated C kinase with GABA type A receptors. *J Neurosci* **19**, 9228-9234.
- Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG and Moss SJ (2000) GABA(A) receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 38856-38862.
- Brandon NJ, Delmas P, Hill J, Smart TG and Moss SJ (2001) Constitutive tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2 subunit in rat brain. *Neuropharmacology* **41**, 745-752.
- Brandon N, Jovanovic J and Moss S (2002a) Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* **94**, 113-122.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, Smart TG and Moss SJ (2002b) Receptor for activated C kinase-1 facilitates protein kinase C-dependent phosphorylation and functional modulation of GABA(A) receptors with the activation of G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* **22**, 6353-6361.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, Colledge M, Kittler JT, Brandon JM, Scott JD and Moss SJ

- (2003) A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* **22**, 87-97.
- Breitinger HG and Becker CM (2002) The inhibitory glycine receptor-simple views of a complicated channel. *Chembiochem* **3**, 1042-1052.
- Breitwieser GE (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* **94**, 17-27.
- Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB and Sixma TK (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269-276.
- Brickley SG, Cull-Candy SG and Farrant M (1999) Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci* **19**, 2960-2973.
- Brickley K, Smith MJ, Beck M and Stephenson FA (2005) GRIF-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* **280**, 14723-14732.
- Britton KT, Page M, Baldwin H and Koob GF (1991) Anxiolytic activity of steroid anesthetic alphaxalone. *J Pharmacol Exp Ther* **258**, 124-129.
- Brkovic A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S and Fournier A (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 1200-1209.
- Brot MD, Akwa Y, Purdy RH, Koob GF and Britton KT (1997) The anxiolytic-like effects of the neurosteroid allopregnanolone: interactions with GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **325**, 1-7.
- Brown DR and Mohn CM (1999) Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* **25**, 282-292.
- Brunig I, Sommer M, Hatt H and Bormann J (1999) Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2456-2460.
- Buck KJ, McQuilkin SJ and Harris RA (1991) Modulation of gamma-aminobutyric acidA receptor-operated chloride channels by benzodiazepine inverse agonists is related to genetic differences in ethanol withdrawal seizure severity. *J Neurochem* **57**, 2100-2105.
- Buhr A, Baur R, Malherbe P and Sigel E (1996) Point mutations of the alpha 1 beta 2 gamma 2 gamma-aminobutyric acid(A) receptor affecting modulation of the channel by ligands

- of the benzodiazepine binding site. *Mol Pharmacol* **49**, 1080-1084.
- Burgard EC, Tietz EI, Neelands TR and Macdonald RL (1996) Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. *Mol Pharmacol* **50**, 119-127.
- Burlet S, Tyler CJ and Leonard CS (2002) Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy. *J Neurosci* **22**, 2862-2872.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH and Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297-308.
- ∞ C ∞
- Callaghan H, Cottrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM and Peters JA (1987) Modulation of the GABAA receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **231**, 359-369.
- Camarda V, Guerrini R, Kostenis E, Rizzi A, Calo G, Hattenberger A, Zucchini M, Salvadori S and Regoli D (2002a) A new ligand for the urotensin II receptor. *Br J Pharmacol* **137**, 311-314.
- Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F and Regoli D (2002b) Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**, 141-149.
- Camarda V, Song W, Marzola E, Spagnol M, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Thompson JP, Rowbotham DJ, Behm DJ, Douglas SA, Calo G and Lambert DG (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *Eur J Pharmacol* **498**, 83-86.
- Campagna JA, Miller KW and Forman SA (2003) Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* **348**, 2110-2124.
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ and Collins S (2000) Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J Biol Chem* **275**, 38131-38134.
- Carlson BX, Engblom AC, Kristiansen U, Schousboe A and Olsen RW (2000) A single glycine residue at the entrance to the first membrane-spanning domain of the gamma-

- aminobutyric acid type A receptor beta(2) subunit affects allosteric sensitivity to GABA and anesthetics. *Mol Pharmacol* **57**, 474-484.
- Carotenuto A, Grieco P, Novellino E and Rovero P (2004) Urotensin-II receptor peptide agonists. *Med Res Rev* **24**, 577-588.
- Carta M, Mameli M and Valenzuela CF (2004) Alcohol enhances GABAergic transmission to cerebellar granule cells via an increase in Golgi cell excitability. *J Neurosci* **24**, 3746-3751.
- Castel H, Jegou S, Tonon MC and Vaudry H (2000) Regulation of the GABA(A) receptor by nitric oxide in frog pituitary melanotrophs. *Endocrinology* **141**, 3451-3460.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihrmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon MC and Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* **99**, 582-595.
- Cestari IN, Uchida I, Li L, Burt D and Yang J (1996) The agonistic action of pentobarbital on GABAA beta-subunit homomeric receptors. *Neuroreport* **7**, 943-947.
- Cestari IN, Min KT, Kulli JC and Yang J (2000) Identification of an amino acid defining the distinct properties of murine beta1 and beta3 subunit-containing GABA(A) receptors. *J Neurochem* **74**, 827-838.
- Chan DK and Bern HA (1976) The caudal neurosecretory system. A critical evaluation of the two-hormone hypothesis. *Cell Tissue Res* **174**, 339-354.
- Chang Y, Wang R, Barot S and Weiss DS (1996) Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J Neurosci* **16**, 5415-5424.
- Chang Y and Weiss DS (1999) Allosteric activation mechanism of the alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acid type A receptor revealed by mutation of the conserved M2 leucine. *Biophys J* **77**, 2542-2551.
- Chang CS, Olcese R and Olsen RW (2003) A single M1 residue in the beta2 subunit alters channel gating of GABAA receptor in anesthetic modulation and direct activation. *J Biol Chem* **278**, 42821-42828.
- Chapell R, Bueno OF, Alvarez-Hernandez X, Robinson LC and Leidenheimer NJ (1998) Activation of protein kinase C induces gamma-aminobutyric acid type A receptor internalization in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* **273**, 32595-32601.
- Chartrel N, Conlon JM, Collin F, Braun B, Waugh D, Vallarino M, Lahrichi SL, Rivier JE and Vaudry H (1996) Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J Comp Neurol* **364**, 324-339.

- Chartrel N, Leprince J, Dujardin C, Chatenet D, Tollemer H, Baroncini M, Balment RJ, Beauvillain JC and Vaudry H (2004) Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *J Neurochem* **91**, 110-118.
- Charych EI, Yu W, Miralles CP, Serwanski DR, Li X, Rubio M and De Blas AL (2004) The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in vesicular trafficking, interacts with the beta subunits of the GABA receptors. *J Neurochem* **90**, 173-189.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boulanan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihrmann I, Pacaud P and Vaudry H (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* **25**, 1819-1830.
- Chen QX, Stelzer A, Kay AR and Wong RK (1990) GABAA receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J Physiol* **420**, 207-221.
- Chen L, Wang H, Vicini S and Olsen RW (2000) The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11557-11562.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olcese R and Olsen RW (2005) GABAA receptor-associated protein regulates GABAA receptor cell-surface number in Xenopus laevis oocytes. *Mol Pharmacol* **68**, 152-159.
- Chen G, Kittler JT, Moss SJ and Yan Z (2006) Dopamine D3 receptors regulate GABAA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* **26**, 2513-2521.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA and Olsen RW (2007) C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* **27**, 6655-6663.
- Chen YL, Liu JC, Loh SH, Chen CH, Hong CY, Chen JJ and Cheng TH (2008) Involvement of reactive oxygen species in urotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *Eur J Pharmacol* **593**, 24-29.
- Cheung BM, Leung R, Man YB and Wong LY (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens* **22**, 1341-1344.
- Chuquet J, Leclerc C, Chatenet D, Leprince J, Chazalviel L, Roussel S, MacKenzie ET, Vaudry H and Touzani O (2008) Effects of urotensin-II on cerebral blood flow and ischemia in anesthetized rats. *Exp Neurol* **210**, 577-584.

- Cinar H and Barnes EM, Jr. (2001) Clathrin-independent endocytosis of GABA(A) receptors in HEK 293 cells. *Biochemistry* **40**, 14030-14036.
- Clark SD, Nothacker HP, Wang Z, Saito Y, Leslie FM and Civelli O (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain Res* **923**, 120-127.
- Clark SD, Nothacker HP, Blaha CD, Tyler CJ, Duangdao DM, Grupke SL, Helton DR, Leonard CS and Civelli O (2005) Urotensin II acts as a modulator of mesopontine cholinergic neurons. *Brain Res* **1059**, 139-148.
- Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF and Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 204-212.
- Concas A, Santoro G, Mascia MP, Serra M, Sanna E and Biggio G (1990) The general anesthetic propofol enhances the function of gamma-aminobutyric acid-coupled chloride channel in the rat cerebral cortex. *J Neurochem* **55**, 2135-2138.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC and Vaudry H (1992a) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 578-583.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Balment RJ and Hazon N (1992b) Purification and characterization of urotensin II and parvalbumin from an elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* (common dogfish). *Neuroendocrinology* **55**, 230-235.
- Conlon JM, Yano K, Waugh D and Hazon N (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J Exp Zool* **275**, 226-238.
- Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG and Moss SJ (1996) Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* **271**, 89-96.
- Connolly CN, Kittler JT, Thomas P, Uren JM, Brandon NJ, Smart TG and Moss SJ (1999) Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J Biol Chem* **274**, 36565-36572.
- Cooper DM, Mons N and Karpen JW (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* **374**, 421-424.
- Cooper DM (2003) Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylylate

- cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* **31**, 912-915.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J and Baulieu EE (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 4704-4707.
- Corringer PJ, Le Novere N and Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 431-458.
- Cosenzi A (2008) Non peptidic urotensin II antagonists: perspectives for a new class of drugs. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **6**, 80-91.
- Couloarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA and Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15803-15808.
- Couloarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H and Lihrmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* **457**, 28-32.
- Couloarn Y, Fernex C, Jegou S, Henderson CE, Vaudry H and Lihrmann I (2001) Specific expression of the urotensin II gene in sacral motoneurons of developing rat spinal cord. *Mech Dev* **101**, 187-190.
- Cowen PJ, Green AR and Nutt DJ (1981) Ethyl beta-carboline carboxylate lowers seizure threshold and antagonizes flurazepam-induced sedation in rats. *Nature* **290**, 54-55.
- Cowley E, Thompson JP, Sharpe P, Waugh J, Ali N and Lambert DG (2005) Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br J Anaesth* **95**, 495-499.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR and Nikolov DB (2002) Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**, 63-74.
- Crestani F, Assandri R, Tauber M, Martin JR and Rudolph U (2002) Contribution of the alpha1-GABA(A) receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. *Neuropharmacology* **43**, 679-684.
- Curtis DR and Gynther BD (1987) Divalent cations reduce depolarization of primary afferent terminations by GABA. *Brain Res* **422**, 192-195.

DOI

- Dalziel JE, Cox GB, Gage PW and Birnir B (2000) Mutating the highly conserved second membrane-spanning region 9' leucine residue in the alpha(1) or beta(1) subunit produces subunit-specific changes in the function of human alpha(1)beta(1) gamma-aminobutyric Acid(A) receptors. *Mol Pharmacol* **57**, 875-882.
- Dan B and Boyd SG (2003) Angelman syndrome reviewed from a neurophysiological perspective. The UBE3A-GABRB3 hypothesis. *Neuropediatrics* **34**, 169-176.
- Darlison MG, Pahal I and Thode C (2005) Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol* **25**, 607-624.
- Davies M, Bateson AN and Dunn SM (1996) Molecular biology of the GABA(A) receptor: functional domains implicated by mutational analysis. *Front Biosci* **1**, d214-233.
- Davies PA, Hanna MC, Hales TG and Kirkness EF (1997a) Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA(A) receptor subunit. *Nature* **385**, 820-823.
- Davies PA, Kirkness EF and Hales TG (1997b) Modulation by general anaesthetics of rat GABA(A) receptors comprised of alpha 1 beta 3 and beta 3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Br J Pharmacol* **120**, 899-909.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG and Kirkness EF (1999) The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* **397**, 359-363.
- Davies PA, Wang W, Hales TG and Kirkness EF (2003) A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J Biol Chem* **278**, 712-717.
- Dawson GR, Maubach KA, Collinson N, Cobain M, Everitt BJ, MacLeod AM, Choudhury HI, McDonald LM, Pillai G, Rycroft W, Smith AJ, Sternfeld F, Tattersall FD, Wafford KA, Reynolds DS, Seabrook GR and Atack JR (2006) An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABA(A) receptors enhances cognition. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1335-1345.
- de Lecea L and Bourgin P (2008) Neuropeptide interactions and REM sleep: a role for Urotensin II? *Peptides* **29**, 845-851.
- Demirgoren S, Majewska MD, Spivak CE and London ED (1991) Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABA(A) receptor. *Neuroscience* **45**, 127-135.
- Derry JM, Dunn SM and Davies M (2004) Identification of a residue in the gamma-

- aminobutyric acid type A receptor alpha subunit that differentially affects diazepam-sensitive and -insensitive benzodiazepine site binding. *J Neurochem* **88**, 1431-1438.
- Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC and Gandolfo P (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**, 813-819.
- Disa J, Floyd LE, Edwards RM, Douglas SA and Aiyar NV (2006) Identification and characterization of binding sites for human urotensin-II in Sprague-Dawley rat renal medulla using quantitative receptor autoradiography. *Peptides* **27**, 1532-1537.
- Dhanak D, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Sulfonamide derivative urotensin-II receptor antagonists, preparation, pharmaceutical compositions, and therapeutic use. *PCT Int Appl.*; 2001a (WO2001045694).
- Dhanak D, Knight SD, Jin J, Keenan RM, Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of Npyrrolidinyl and N-piperidinyl amide derivatives as urotensin-II receptor antagonists. *PCT Int Appl.*; 2001b (WO2001045711).
- Dhanak D, Knight SD, Warren GL, Jin J, Widdowson KL, Keenan RM. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Pyrrolidine derivative urotensin II receptor antagonists, their preparation, and therapeutic use. *PCT Int Appl.*; 2001c (WO2001045700).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002a (WO2002090353).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002b (WO2002089740).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002c (WO2002089792).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002d (WO2002089793).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002e (WO2002090348).
- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD, Schmidt SJ. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002f (WO2002089785).

- Dhanak D, Gallagher TF, Knight SD, Schmidt SJ. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of sulfonamides as antagonists of urotensin II. *PCT Int Appl.*; 2002g (WO2002090337).
- Dhanak D, Knight SD. Smithkline Beecham Corporation (assignee). Preparation of quinolones as urotensin-II receptor antagonists. *PCT Int Appl.*; 2002h (WO2002047456).
- Djordjevic T, BelAiba RS, Bonello S, Pfeilschifter J, Hess J and Gorlach A (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 519-525.
- Doble A (1999) New insights into the mechanism of action of hypnotics. *J Psychopharmacol* **13**, S11-20.
- Do-Rego JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H and Costentin J (2005) Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **183**, 103-117.
- Douglas SA and Ohlstein EH (2000) Urotensin receptors. *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. Edited by Girdlestone D. London: IUPHAR Media; **2000**, 365-372.
- Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH and Willette RN (2000) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* **131**, 1262-1274.
- Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N and Giaid A (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* **359**, 1990-1997.
- Douglas SA, Dhanak D and Johns DG (2004a) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 76-85.
- Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F and Aiyar NV (2004b) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *Br J Pharmacol* **142**, 921-932.
- Douglas SA, Behm DJ, Aiyar NV, Naselsky D, Disa J, Brooks DP, Ohlstein EH, Gleason JG, Sarau HM, Foley JJ, Buckley PT, Schmidt DB, Wixted WE, Widdowson K, Riley G, Jin J, Gallagher TF, Schmidt SJ, Ridgers L, Christmann LT, Keenan RM, Knight SD and Dhanak D (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: in vitro pharmacological characterization of SB-706375. *Br J Pharmacol* **145**, 620-635.
- Draguhn A, Verdorn TA, Ewert M, Seuberg PH and Sakmann B (1990) Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA_A receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron* **5**, 781-788.

- Drescher DG, Green GE, Khan KM, Hajela K, Beisel KW, Morley BJ and Gupta AK (1993) Analysis of gamma-aminobutyric acidA receptor subunits in the mouse cochlea by means of the polymerase chain reaction. *J Neurochem* **61**, 1167-1170.
- Dschietzig T, Bartsch C, Pregla R, Zurbrugg HR, Armbruster FP, Richter C, Laule M, Romeyke E, Neubert C, Voelter W, Baumann G and Stangl K (2002) Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul Pept* **110**, 33-38.
- D'Souza-Schorey C and Chavrier P (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-358.
- Ducic I, Caruncho HJ, Zhu WJ, Vicini S and Costa E (1995) gamma-Aminobutyric acid gating of Cl⁻ channels in recombinant GABA_A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **272**, 438-445.
- Duggan MJ, Pollard S and Stephenson FA (1991) Immunoaffinity purification of GABA_A receptor alpha-subunit iso-oligomers. Demonstration of receptor populations containing alpha 1 alpha 2, alpha 1 alpha 3, and alpha 2 alpha 3 subunit pairs. *J Biol Chem* **266**, 24778-24784.
- Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK and Dun NJ (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* **305**, 9-12.
- Dunn SM, Davies M, Muntoni AL and Lambert JJ (1999) Mutagenesis of the rat alpha1 subunit of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor reveals the importance of residue 101 in determining the allosteric effects of benzodiazepine site ligands. *Mol Pharmacol* **56**, 768-774.
- Dunne EL, Hosie AM, Wooltorton JR, Duguid IC, Harvey K, Moss SJ, Harvey RJ and Smart TG (2002) An N-terminal histidine regulates Zn(2+) inhibition on the murine GABA(A) receptor beta3 subunit. *Br J Pharmacol* **137**, 29-38.



- Egginger JG and Calas A (2005) A novel hypothalamic neuroendocrine peptide: URP (urotensin-II-related peptide)? *C R Biol* **328**, 724-731.
- Egginger JG, Camus A and Calas A (2006) Urotensin-II expression in the mouse spinal cord. *J Chem Neuroanat* **31**, 146-154.
- Eghbali M, Curmi JP, Birnir B and Gage PW (1997) Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. *Nature* **388**, 71-75.

- Ehya N, Sarto I, Wabnugger L and Sieghart W (2003) Identification of an amino acid sequence within GABA(A) receptor beta3 subunits that is important for receptor assembly. *J Neurochem* **84**, 127-135.
- Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG and Balice-Gordon RJ (2005) Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABA(A) receptors. *J Neurosci* **25**, 3638-3650.
- Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff BE, Naselsky D, Disa J and Aiyar NV (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *Br J Pharmacol* **136**, 9-22.
- Engblom AC, Carlson BX, Olsen RW, Schousboe A and Kristiansen U (2002) Point mutation in the first transmembrane region of the beta 2 subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor alters desensitization kinetics of gamma-aminobutyric acid- and anesthetic-induced channel gating. *J Biol Chem* **277**, 17438-17447.
- Ernst M, Brauchart D, Boresch S and Sieghart W (2003) Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience* **119**, 933-943.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM and Lüscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**, 563-571.
- Everitt AB, Luu T, Cromer B, Tierney ML, Birnir B, Olsen RW and Gage PW (2004) Conductance of recombinant GABA (A) channels is increased in cells co-expressing GABA(A) receptor-associated protein. *J Biol Chem* **279**, 21701-21706.
- Everitt AB, Seymour VA, Curmi J, Laver DR, Gage PW and Tierney ML (2009) Protein interactions involving the gamma2 large cytoplasmic loop of GABA(A) receptors modulate conductance. *Faseb J* **23**, 4361-4369.



Fang C, Deng L, Keller CA, Fukata M, Fukata Y, Chen G and Lüscher B (2006) GODZ-mediated palmitoylation of GABA(A) receptors is required for normal assembly and function of GABAergic inhibitory synapses. *J Neurosci* **26**, 12758-12768.

Farrant M and Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* **6**, 215-229.

Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP and McKernan RM (1999) Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* **274**, 10100-10104.

- Fatima-Shad K and Barry PH (1993) Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons. *Proc Biol Sci* **253**, 69-75.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB and Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* **24**, 2143-2155.
- Feindt J, Becker I, Blomer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B and Mentlein R (1995) Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* **65**, 1997-2005.
- Feng J, Cai X, Zhao J and Yan Z (2001) Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *J Neurosci* **21**, 6502-6511.
- Feng HJ and Macdonald RL (2004) Proton modulation of alpha 1 beta 3 delta GABAA receptor channel gating and desensitization. *J Neurophysiol* **92**, 1577-1585.
- Filipeanu CM, Brailoiu E, Le Dun S and Dun NJ (2002) Urotensin-II regulates intracellular calcium in dissociated rat spinal cord neurons. *J Neurochem* **83**, 879-884.
- Filippova N, Sedelnikova A, Zong Y, Fortinberry H and Weiss DS (2000) Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid (GABA)(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. *Mol Pharmacol* **57**, 847-856.
- Findlay GS, Ueno S, Harrison NL and Harris RA (2001) Allosteric modulation in spontaneously active mutant gamma-aminobutyric acidA receptors. *Neurosci Lett* **305**, 77-80.
- Fischer F, Kneussel M, Tintrup H, Haverkamp S, Rauen T, Betz H and Wassle H (2000) Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J Comp Neurol* **427**, 634-648.
- Fisher JL and Macdonald RL (1997a) Functional properties of recombinant GABA(A) receptors composed of single or multiple beta subunit subtypes. *Neuropharmacology* **36**, 1601-1610.
- Fisher JL and Macdonald RL (1997b) Single channel properties of recombinant GABAA receptors containing gamma 2 or delta subtypes expressed with alpha 1 and beta 3 subtypes in mouse L929 cells. *J Physiol* **505 (Pt 2)**, 283-297.
- Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A and Klabunde T (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem* **45**, 1799-1805.
- Flores-Hernandez J, Hernandez S, Snyder GL, Yan Z, Fienberg AA, Moss SJ, Greengard P

- and Surmeier DJ (2000) D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J Neurophysiol* **83**, 2996-3004.
- Fonfria E, Rodriguez-Farre E and Sunol C (2001) Mercury interaction with the GABA(A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **41**, 819-833.
- Franks NP and Lieb WR (1997) Inhibitory synapses. Anaesthetics set their sites on ion channels. *Nature* **389**, 334-335.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H and MacVicar BA (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* **15**, 2720-2732.
- Fritschy JM and Mohler H (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* **359**, 154-194.
- Fujimura J, Nagano M and Suzuki H (2005) Differential expression of GABA(A) receptor subunits in the distinct nuclei of the rat amygdala. *Brain Res Mol Brain Res* **138**, 17-23.
- G
- Galzi JL, Devillers-Thiery A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP and Bertrand D (1992) Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* **359**, 500-505.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP and Bennett T (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* **132**, 1625-1629.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA and Bennett T (2004) Bolus injection of human UII in conscious rats evokes a biphasic haemodynamic response. *Br J Pharmacol* **143**, 422-430.
- Gardner CR, Tully WR and Hedgecock CJ (1993) The rapidly expanding range of neuronal benzodiazepine receptor ligands. *Prog Neurobiol* **40**, 1-61.
- Gartlon J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, Hughes ZA, Taylor SG, Munton RP, Hagan JJ, Hunter JA and Jones DN (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **155**, 426-433.
- Gasser UE and Hatten ME (1990) Central nervous system neurons migrate on astroglial fibers from heterotypic brain regions in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4543-4547.

- Gee KW, Joy DS and Belelli D (1989) Complex interactions between pregnenolone sulfate and the t-butylbicyclicphosphorothionate-labeled chloride ionophore in rat brain. *Brain Res* **482**, 169-173.
- Gendron G, Simard B, Gobeil F, Jr., Sirois P, D'Orleans-Juste P and Regoli D (2004) Human urotensin-II enhances plasma extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol* **82**, 16-21.
- Gibson A, Bern HA, Ginsburg M and Botting JH (1984) Neuropeptide-induced contraction and relaxation of the mouse anococcygeus muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 625-629.
- Gibson A, Wallace P and Bern HA (1986) Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *Gen Comp Endocrinol* **64**, 435-439.
- Gibson A (1987) Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol* **91**, 205-212.
- Gibson A, Conyers S and Bern HA (1988) The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *J Pharm Pharmacol* **40**, 893-895.
- Giebing G, Tolle M, Jurgensen J, Eichhorst J, Ferkert J, Beyermann M, Neuschafer-Rube F, Rosenthal W, Zidek W, van der Giet M and Oksche A (2005) Arrestin-independent internalization and recycling of the urotensin receptor contribute to long-lasting urotensin II-mediated vasoconstriction. *Circ Res* **97**, 707-715.
- Goei VL, Choi J, Ahn J, Bowlus CL, Raha-Chowdhury R and Gruen JR (1998) Human gamma-aminobutyric acid B receptor gene: complementary DNA cloning, expression, chromosomal location, and genomic organization. *Biol Psychiatry* **44**, 659-666.
- Goetz T, Arslan A, Wisden W and Wulff P (2007) GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res* **160**, 21-41.
- Gong H, Wang YX, Zhu YZ, Wang WW, Wang MJ, Yao T and Zhu YC (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *J Appl Physiol* **97**, 2228-2235.
- Gorrie GH, Vallis Y, Stephenson A, Whitfield J, Browning B, Smart TG and Moss SJ (1997) Assembly of GABAA receptors composed of alpha1 and beta2 subunits in both cultured neurons and fibroblasts. *J Neurosci* **17**, 6587-6596.
- Goto H, Terunuma M, Kanematsu T, Misumi Y, Moss SJ and Hirata M (2005) Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* **30**, 197-206.
- Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC and De Camilli P (1997) The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single

- site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* **272**, 13419-13425.
- Granier S, Terrillon S, Pascal R, Demene H, Bouvier M, Guillon G and Mendre C (2004) A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *J Biol Chem* **279**, 50904-50914.
- Grau EG, Nishioka RS and Bern HA (1982) Effects of somatostatin and urotensin II on tilapia pituitary prolactin release and interactions between somatostatin, osmotic pressure Ca++, and adenosine 3',5'-monophosphate in prolactin release in vitro. *Endocrinology* **110**, 910-915.
- Gravielle MC, de Novara AM and de Plazas SF (1999) Modulatory action of zinc on GABA(A) receptor complex during avian CNS development. *J Neurosci Res* **57**, 536-540.
- Gray GA, Jones MR and Sharif I (2001) Human urotensin II increases coronary perfusion pressure in the isolated rat heart: potentiation by nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition. *Life Sci* **69**, 175-180.
- Grenningloh G, Gundelfinger E, Schmitt B, Betz H, Darlison MG, Barnard EA, Schofield PR and Seuberg PH (1987) Glycine vs GABA receptors. *Nature* **330**, 25-26.
- Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Zampelli E, Patacchini R, Maggi CA, Novellino E and Rovero P (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J Med Chem* **45**, 4391-4394.
- Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Auriemma L, Sala M, Marcozzi C, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Brancaccio D, Rovero P, Santicioli P, Meini S, Maggi CA and Novellino E (2009) New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on P5U and urantide. *J Med Chem* **52**, 3927-3940.
- Grifa A, Totaro A, Rommens JM, Carella M, Roetto A, Borgato L, Zelante L and Gasparini P (1998) GABA (gamma-amino-butyric acid) neurotransmission: identification and fine mapping of the human GABAB receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 240-245.
- Guerrini R, Camarda V, Marzola E, Arduin M, Calo G, Spagnol M, Rizzi A, Salvadori S and Regoli D (2005) Structure-activity relationship study on human urotensin II. *J Pept Sci* **11**, 85-90.

H

- Haas KF and Macdonald RL (1999) GABAA receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* **514** (Pt 1), 27-45.
- Hackam AS, Wang TL, Guggino WB and Cutting GR (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *J Biol Chem* **272**, 13750-13757.
- Hadingham KL, Garrett EM, Wafford KA, Bain C, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ and Whiting PJ (1996) Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. *Mol Pharmacol* **49**, 253-259.
- Haefely W, Facklam M, Schoch P, Martin JR, Bonetti EP, Moreau JL, Jenck F and Richards JG (1992) Partial agonists of benzodiazepine receptors for the treatment of epilepsy, sleep, and anxiety disorders. *Adv Biochem Psychopharmacol* **47**, 379-394.
- Hales TG, Tang H, Bollan KA, Johnson SJ, King DP, McDonald NA, Cheng A and Connolly CN (2005) The epilepsy mutation, gamma2(R43Q) disrupts a highly conserved inter-subunit contact site, perturbing the biogenesis of GABAA receptors. *Mol Cell Neurosci* **29**, 120-127.
- Hall AC, Lieb WR and Franks NP (1994) Stereoselective and non-stereoselective actions of isoflurane on the GABAA receptor. *Br J Pharmacol* **112**, 906-910.
- Hamann M, Desarmenien M, Desaulles E, Bader MF and Feltz P (1988) Quantitative evaluation of the properties of a pyridazinyl GABA derivative (SR 95531) as a GABAA competitive antagonist. An electrophysiological approach. *Brain Res* **442**, 287-296.
- Hamill OP and Sakmann B (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* **294**, 462-464.
- Hamill OP, Bormann J and Sakmann B (1983) Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* **305**, 805-808.
- Hammond C and Helenius A (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**, 41-52.
- Hanchar HJ, Wallner M and Olsen RW (2004) Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci* **76**, 1-8.

- Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS and Wallner M (2005) Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* **8**, 339-345.
- Hanchar HJ, Chutsrinopkun P, Meera P, Supavilai P, Sieghart W, Wallner M and Olsen RW (2006) Ethanol potently and competitively inhibits binding of the alcohol antagonist Ro15-4513 to alpha4/beta3delta GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8546-8551.
- Hara M, Kai Y and Ikemoto Y (1994) Enhancement by propofol of the gamma-aminobutyric acidA response in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat. *Anesthesiology* **81**, 988-994.
- Harris RA, Mihic SJ, Dildy-Mayfield JE and Machu TK (1995) Actions of anesthetics on ligand-gated ion channels: role of receptor subunit composition. *Faseb J* **9**, 1454-1462.
- Harrison NL and Simmonds MA (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* **323**, 287-292.
- Harrison NL, Kugler JL, Jones MV, Greenblatt EP and Pritchett DB (1993) Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol Pharmacol* **44**, 628-632.
- Harrison NL (2007) Mechanisms of sleep induction by GABA(A) receptor agonists. *J Clin Psychiatry* **68 Suppl 5**, 6-12.
- Hartvig L, Lukensmejer B, Liljefors T and Dekermendjian K (2000) Two conserved arginines in the extracellular N-terminal domain of the GABA(A) receptor alpha(5) subunit are crucial for receptor function. *J Neurochem* **75**, 1746-1753.
- Harvey RJ, Kim HC and Darlison MG (1993) Molecular cloning reveals the existence of a fourth gamma subunit of the vertebrate brain GABAA receptor. *FEBS Lett* **331**, 211-216.
- Harvey RJ, Chinchotra MA and Darlison MG (1994) Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of the chicken gamma-aminobutyric acidA receptor beta 2 subunit. *J Neurochem* **62**, 10-16.
- Hassan GS, Chouiali F, Saito T, Hu F, Douglas SA, Ao Z, Willette RN, Ohlstein EH and Giaid A (2003) Effect of human urotensin-II infusion on hemodynamics and cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol* **81**, 125-128.
- Hedblom E and Kirkness EF (1997) A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J Biol Chem* **272**, 15346-15350.
- Helenius A and Aeby M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019-1049.
- Henschel O, Gipson KE and Bordey A (2008) GABAA receptors, anesthetics and

- anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 211-224.
- Hentschke H, Schwarz C and Antkowiak B (2005) Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA_A receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci* **21**, 93-102.
- Herb A, Wisden W, Luddens H, Puia G, Vicini S and Seburg PH (1992) The third gamma subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1433-1437.
- Herring D, Huang R, Singh M, Robinson LC, Dillon GH and Leidenheimer NJ (2003) Constitutive GABA_A receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* **278**, 24046-24052.
- Herring D, Huang R, Singh M, Dillon GH and Leidenheimer NJ (2005) PKC modulation of GABA_A receptor endocytosis and function is inhibited by mutation of a dileucine motif within the receptor beta 2 subunit. *Neuropharmacology* **48**, 181-194.
- Hevers W and Luddens H (1998) The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**, 35-86.
- Hill-Venning C, Belotti D, Peters JA and Lambert JJ (1997) Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol* **120**, 749-756.
- Hinkle DJ and Macdonald RL (2003) Beta subunit phosphorylation selectively increases fast desensitization and prolongs deactivation of alpha1beta1gamma2L and alpha1beta3gamma2L GABA(A) receptor currents. *J Neurosci* **23**, 11698-11710.
- Hirose S (2003) [Genetics of epilepsy]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* **105**, 407-412.
- Hoffman EJ and Warren EW (1993) Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. *Clin Pharm* **12**, 641-656; quiz 699-701.
- Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E and Leduc R (2007) Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* **402**, 51-61.
- Holleran BJ, Domazet I, Beaulieu ME, Yan LP, Guillemette G, Lavigne P, Escher E and Leduc R (2009) Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem Pharmacol* **77**, 1374-1382.
- Holloway MP and Bram RJ (1998) Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J Biol Chem* **273**, 16346-16350.
- Horenstein J, Wagner DA, Czajkowski C and Akabas MH (2001) Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment.

- Nat Neurosci* **4**, 477-485.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ and Smart TG (2003) Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* **6**, 362-369.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM and Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**, 486-489.
- Hosie AM, Wilkins ME and Smart TG (2007) Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* **116**, 7-19.
- Hosie AM, Clarke L, da Silva H and Smart TG (2009) Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacology* **56**, 149-154.
- Hosli E, Otten U and Hosli L (1997) Expression of GABA(A) receptors by reactive astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS. *Int J Dev Neurosci* **15**, 949-960.
- Houston CM, Hosie AM and Smart TG (2008) Distinct regulation of beta2 and beta3 subunit-containing cerebellar synaptic GABAA receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* **28**, 7574-7584.
- Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS and de Lecea L (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *J Neurosci* **25**, 5465-5474.
- Hunkeler W, Mohler H, Pieri L, Polc P, Bonetti EP, Cumin R, Schaffner R and Haefely W (1981) Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* **290**, 514-516.
- Hutcheon B, Fritschy JM and Poulter MO (2004) Organization of GABA receptor alpha-subunit clustering in the developing rat neocortex and hippocampus. *Eur J Neurosci* **19**, 2475-2487.
- Ichikawa T, Lederis K and Kobayashi H (1984) Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, Cyprinus carpio. *Gen Comp Endocrinol* **55**, 133-141.
- Iida A and Nakamura Y (2005) Identification of 156 novel SNPs in 29 genes encoding G-protein coupled receptors. *J Hum Genet* **50**, 182-191.
- Im MS, Hamilton BJ, Carter DB and Im WB (1992) Selective potentiation of GABA-



- Ichikawa T, Lederis K and Kobayashi H (1984) Primary structures of multiple forms of urotensin II in the urophysis of the carp, Cyprinus carpio. *Gen Comp Endocrinol* **55**, 133-141.
- Iida A and Nakamura Y (2005) Identification of 156 novel SNPs in 29 genes encoding G-protein coupled receptors. *J Hum Genet* **50**, 182-191.
- Im MS, Hamilton BJ, Carter DB and Im WB (1992) Selective potentiation of GABA-

- mediated Cl- current by lanthanum ion in subtypes of cloned GABAA receptors. *Neurosci Lett* **144**, 165-168.
- Im WB and Pregenzer JF (1993) Interaction of La³⁺ with GABAA receptors in rat cerebrocortical membranes as detected with [³⁵S]t-butylbicyclicophosphorothionate binding. *Eur J Pharmacol* **245**, 111-117.
- Im WB, Binder JA, Dillon GH, Pregenzer JF, Im HK and Altman RA (1995) Acceleration of GABA-dependent desensitization by mutating threonine 266 to alanine of the alpha 6 subunit of rat GABAA receptors. *Neurosci Lett* **186**, 203-207.
- Inomata N, Oomura Y, Akaike N and Edwards C (1986) The anion selectivity of the gamma-aminobutyric acid controlled chloride channel in the perfused spinal ganglion cell of frog. *Neurosci Res* **3**, 371-383.
- Irifune M, Sato T, Kamata Y, Nishikawa T, Dohi T and Kawahara M (2000) Evidence for GABA(A) receptor agonistic properties of ketamine: convulsive and anesthetic behavioral models in mice. *Anesth Analg* **91**, 230-236.
- Itoh H, McMaster D and Lederis K (1988) Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol* **149**, 61-66.



- Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG and Moss SJ (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J Neurosci* **25**, 10469-10478.
- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Prézeau L, Castel H and Gandolfo P. The vasoactive peptides Urotensin II and Urotensin II-related peptide regulate astrocytes activity through common and distinct mechanisms. Involvement in cell proliferation. (*in press*).
- Jassar BS, Ostashewski PM and Jhamandas JH (1997) GABAA receptor modulation by protein tyrosine kinase in the rat diagonal band of Broca. *Brain Res* **775**, 127-133.
- Jechlinger M, Pelz R, Tretter V, Klausberger T and Sieghart W (1998) Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing alpha6 subunits. *J Neurosci* **18**, 2449-2457.
- Jegou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, LePrince J, Vaudry H and Lihrmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **495**, 21-36.

- Jenkins A, Greenblatt EP, Faulkner HJ, Bertaccini E, Light A, Lin A, Andreasen A, Viner A, Trudell JR and Harrison NL (2001) Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within the GABA(A) receptor. *J Neurosci* **21**, RC136.
- Jenkins A, Andreasen A, Trudell JR and Harrison NL (2002) Tryptophan scanning mutagenesis in TM4 of the GABA(A) receptor alpha1 subunit: implications for modulation by inhaled anesthetics and ion channel structure. *Neuropharmacology* **43**, 669-678.
- Jensen ML, Timmermann DB, Johansen TH, Schousboe A, Varming T and Ahring PK (2002) The beta subunit determines the ion selectivity of the GABA(A) receptor. *J Biol Chem* **277**, 41438-41447.
- Jensen ML, Schousboe A and Ahring PK (2005) Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J Neurochem* **92**, 217-225.
- Jin P, Walther D, Zhang J, Rowe-Teeter C and Fu GK (2004) Serine 171, a conserved residue in the gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor gamma2 subunit, mediates subunit interaction and cell surface localization. *J Biol Chem* **279**, 14179-14183.
- Jin J, Dhanak D, Knight SD, Widdowson K, Aiyar N, Naselsky D, Sarau HM, Foley JJ, Schmidt DB, Bennett CD, Wang B, Warren GL, Moore ML, Keenan RM, Rivero RA and Douglas SA (2005) Aminoalkoxybenzyl pyrrolidines as novel human urotensin-II receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 3229-3232.
- Jones-Davis DM and Macdonald RL (2003) GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 12-18.
- Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG and Moss SJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci* **24**, 522-530.
- Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt KE, Ledermann B, Antkowiak B and Rudolph U (2003) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *Faseb J* **17**, 250-252.



Kaila K (1994) Ionic basis of GABA(A) receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* **42**, 489-537.

Kaneda M, Mochizuki M, Aoki K and Kaneko A (1997) Modulation of GABA(C) response by Ca²⁺ and other divalent cations in horizontal cells of the catfish retina. *J Gen Physiol*

- 110, 741-747.
- Kaneko A and Tachibana M (1986) Blocking effects of cobalt and related ions on the gamma-aminobutyric acid-induced current in turtle retinal cones. *J Physiol* **373**, 463-479.
- Kanematsu T, Jang IS, Yamaguchi T, Nagahama H, Yoshimura K, Hidaka K, Matsuda M, Takeuchi H, Misumi Y, Nakayama K, Yamamoto T, Akaike N, Hirata M and Nakayama K (2002) Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function. *Embo J* **21**, 1004-1011.
- Kanematsu T, Yasunaga A, Mizoguchi Y, Kuratani A, Kittler JT, Jovanovic JN, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Moss SJ, Nabekura J and Hirata M (2006) Modulation of GABA(A) receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *J Biol Chem* **281**, 22180-22189.
- Kanematsu T, Fujii M, Mizokami A, Kittler JT, Nabekura J, Moss SJ and Hirata M (2007a) Phospholipase C-related inactive protein is implicated in the constitutive internalization of GABAA receptors mediated by clathrin and AP2 adaptor complex. *J Neurochem* **101**, 898-905.
- Kanematsu T, Mizokami A, Watanabe K and Hirata M (2007b) Regulation of GABA(A)-receptor surface expression with special reference to the involvement of GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein) and PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein). *J Pharmacol Sci* **104**, 285-292.
- Kano M and Konnerth A (1992) Potentiation of GABA-mediated currents by cAMP-dependent protein kinase. *Neuroreport* **3**, 563-566.
- Kano M, Rexhausen U, Dreessen J and Konnerth A (1992) Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* **356**, 601-604.
- Kano M, Kano M, Fukunaga K and Konnerth A (1996) Ca(2+)-induced rebound potentiation of gamma-aminobutyric acid-mediated currents requires activation of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13351-13356.
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR and Harrison NL (2003) Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* **421**, 272-275.
- Kash TL, Trudell JR and Harrison NL (2004) Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem Soc Trans* **32**, 540-546.
- Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T and Horie T (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *Eur J Pharmacol*

- 402, R5-7.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W and Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* **386**, 239-246.
- Kawaguchi SY and Hirano T (2007) Sustained structural change of GABA(A) receptor-associated protein underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J Neurosci* **27**, 6788-6799.
- Kawaguchi Y, Ono T, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA and Hirota K (2009) The effects of benzodiazepines on urotensin II-stimulated norepinephrine release from rat cerebrocortical slices. *Anesth Analg* **108**, 1177-1181.
- Kellenberger S, Malherbe P and Sigel E (1992) Function of the alpha 1 beta 2 gamma 2S gamma-aminobutyric acid type A receptor is modulated by protein kinase C via multiple phosphorylation sites. *J Biol Chem* **267**, 25660-25663.
- Keller CA, Yuan X, Panzanelli P, Martin ML, Alldred M, Sasse-Pognetto M and Luscher B (2004) The gamma2 subunit of GABA(A) receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J Neurosci* **24**, 5881-5891.
- Kelsall CJ and Balment RJ (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol* **112**, 210-219.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR and Barry PH (2004) Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* **86**, 161-204.
- Khan ZU, Gutierrez A and De Blas AL (1994) The subunit composition of a GABAA/benzodiazepine receptor from rat cerebellum. *J Neurochem* **63**, 371-374.
- Khan ZU, Gutierrez A, Miralles CP and De Blas AL (1996) The gamma subunits of the native GABAA/benzodiazepine receptors. *Neurochem Res* **21**, 147-159.
- Khom S, Baburin I, Timin EN, Hohaus A, Sieghart W and Hering S (2006) Pharmacological properties of GABAA receptors containing gamma1 subunits. *Mol Pharmacol* **69**, 640-649.
- Killisch I, Dotti CG, Laurie DJ, Luddens H and Seuberg PH (1991) Expression patterns of GABAA receptor subtypes in developing hippocampal neurons. *Neuron* **7**, 927-936.
- Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA and Kwatra MM (2000) Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ Res* **87**, 705-709.

- Kim Y, Glatt H, Xie W, Sinnett D and Lalande M (1997) Human gamma-aminobutyric acid-type A receptor alpha5 subunit gene (GABRA5): characterization and structural organization of the 5' flanking region. *Genomics* **42**, 378-387.
- Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA and Maryanoff BE (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 2940-2944.
- Kirkness EF and Fraser CM (1993) A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human gamma-aminobutyric acid-type A receptor beta 3 subunit (GABRB3). *J Biol Chem* **268**, 4420-4428.
- Kittler JT, Wang J, Connolly CN, Vicini S, Smart TG and Moss SJ (2000a) Analysis of GABA_A receptor assembly in mammalian cell lines and hippocampal neurons using gamma 2 subunit green fluorescent protein chimeras. *Mol Cell Neurosci* **16**, 440-452.
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG and Moss SJ (2000b) Constitutive endocytosis of GABA_A receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 7972-7977.
- Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A and Moss SJ (2001) The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* **18**, 13-25.
- Kittler JT, McAinsh K and Moss SJ (2002) Mechanisms of GABA_A receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* **26**, 251-268.
- Kittler JT and Moss SJ (2003) Modulation of GABA_A receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 341-347.
- Kittler JT, Thomas P, Tretter V, Bogdanov YD, Haucke V, Smart TG and Moss SJ (2004a) Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12736-12741.
- Kittler JT, Arancibia-Carcamo IL and Moss SJ (2004b) Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses. *Biochem Pharmacol* **68**, 1649-1654.
- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z and Moss SJ (2005) Phospho-dependent binding of

- the clathrin AP2 adaptor complex to GABA_A receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14871-14876.
- Kittler JT, Chen G, Kukhtina V, Vahedi-Faridi A, Gu Z, Tretter V, Smith KR, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Saenger W, Haucke V, Yan Z and Moss SJ (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABA_A receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3616-3621.
- Klausberger T, Fuchs K, Mayer B, Ehya N and Sieghart W (2000) GABA(A) receptor assembly. Identification and structure of gamma(2) sequences forming the intersubunit contacts with alpha(1) and beta(3) subunits. *J Biol Chem* **275**, 8921-8928.
- Klausberger T, Sarto I, Ehya N, Fuchs K, Furtmuller R, Mayer B, Huck S and Sieghart W (2001) Alternate use of distinct intersubunit contacts controls GABA_A receptor assembly and stoichiometry. *J Neurosci* **21**, 9124-9133.
- Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, Kumar S, Soccio RE, Kedersha NL, Gill G and Howley PM (2000) The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* **6**, 409-419.
- Kleijnen MF, Alarcon RM and Howley PM (2003) The ubiquitin-associated domain of hPLIC-2 interacts with the proteasome. *Mol Biol Cell* **14**, 3868-3875.
- Kleizen B and Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 343-349.
- Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U and Betz H (1999) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* **19**, 9289-9297.
- Kneussel M, Haverkamp S, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW and Betz H (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8594-8599.
- Kneussel M, Brandstatter JH, Gasnier B, Feng G, Sanes JR and Betz H (2001) Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* **17**, 973-982.
- Knoflach F, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P and Mohler H (1993) Full and partial agonism displayed by benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 385-391.
- Knoflach F, Benke D, Wang Y, Scheurer L, Luddens H, Hamilton BJ, Carter DB, Mohler H and Benson JA (1996) Pharmacological modulation of the diazepam-insensitive recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors alpha 4 beta 2 gamma 2 and alpha 6

- beta 2 gamma 2. *Mol Pharmacol* **50**, 1253-1261.
- Kobilka B (2004) Agonist binding: a multistep process. *Mol Pharmacol* **65**, 1060-1062.
- Kofuji P, Wang JB, Moss SJ, Huganir RL and Burt DR (1991) Generation of two forms of the gamma-aminobutyric acidA receptor gamma 2-subunit in mice by alternative splicing. *J Neurochem* **56**, 713-715.
- Koltchine VV, Finn SE, Jenkins A, Nikolaeva N, Lin A and Harrison NL (1999) Agonist gating and isoflurane potentiation in the human gamma-aminobutyric acid type A receptor determined by the volume of a second transmembrane domain residue. *Mol Pharmacol* **56**, 1087-1093.
- Korpi ER, Kuner T, Kristo P, Kohler M, Herb A, Luddens H and Seuberg PH (1994) Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar alpha 6 subunit abolishes GABA_A receptor function. *J Neurochem* **63**, 1167-1170.
- Korpi ER, Makela R and Uusi-Oukari M (1998) Ethanol: Novel Actions on Nerve Cell Physiology Explain Impaired Functions. *News Physiol Sci* **13**, 164-170.
- Korpi ER, Grunder G and Luddens H (2002) Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* **67**, 113-159.
- Korpi ER and Sinkkonen ST (2006) GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol Ther* **109**, 12-32.
- Korpi ER, Debus F, Linden AM, Malecot C, Leppa E, Vekovischeva O, Rabe H, Bohme I, Aller MI, Wisden W and Luddens H (2007) Does ethanol act preferentially via selected brain GABA_A receptor subtypes? the current evidence is ambiguous. *Alcohol* **41**, 163-176.
- Koulen P, Brandstatter JH, Enz R, Bormann J and Wassle H (1998) Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. *Eur J Neurosci* **10**, 115-127.
- Kralic JE, O'Buckley TK, Khisti RT, Hodge CW, Homanics GE and Morrow AL (2002) GABA(A) receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology* **43**, 685-694.
- Krampfl K, Wolfes H, Dengler R and Bufler J (2002) Kinetic analysis of the agonistic and blocking properties of pentobarbital on recombinant rat alpha(1)beta(2)gamma(2S) GABA(A) receptor channels. *Eur J Pharmacol* **435**, 1-8.
- Krasowski MD, O'Shea SM, Rick CE, Whiting PJ, Hadingham KL, Czajkowski C and Harrison NL (1997) Alpha subunit isoform influences GABA(A) receptor modulation by propofol. *Neuropharmacology* **36**, 941-949.
- Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, Ye Q, Finn SE and Harrison NL (1998) Propofol

- and other intravenous anesthetics have sites of action on the gamma-aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. *Mol Pharmacol* **53**, 530-538.
- Krasowski MD and Harrison NL (2000) The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *Br J Pharmacol* **129**, 731-743.
- Krasowski MD, Nishikawa K, Nikolaeva N, Lin A and Harrison NL (2001) Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor beta subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology* **41**, 952-964.
- Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Huganir RL, Moss SJ and Smart TG (1994) Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* **12**, 1081-1095.
- Krishek BJ, Moss SJ and Smart TG (1996) Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Mol Pharmacol* **49**, 494-504.
- ❧ L ☯
- Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P and Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* **18**, 77-88.
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J and Kettenmann H (1998) Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci* **10**, 231-238.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C and Peters JA (1995) Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 295-303.
- Lambert S, Arras M, Vogt KE and Rudolph U (2005) Isoflurane-induced surgical tolerance mediated only in part by beta3-containing GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol* **516**, 23-27.
- Lancien F, Leprince J, Mimassi N, Mabin D, Vaudry H and Le Mevel JC (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* **1023**, 167-174.
- Langer SZ, Faure-Halley C, Seeburg P, Graham D and Arbillia S (1992). The selectivity of zolpidem and alpidem for the α1-subunit of the GABA_A receptor. *Eur Neuropsychopharmacol* **2**, 232-234.

- Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM and Gilbert RE (2004) Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* **44**, 826-831.
- Lasham A, Vreugdenhil E, Bateson AN, Barnard EA and Darlison MG (1991) Conserved organization of gamma-aminobutyric acidA receptor genes: cloning and analysis of the chicken beta 4-subunit gene. *J Neurochem* **57**, 352-355.
- Laurie DJ, Wisden W and Seeburg PH (1992a) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* **12**, 4151-4172.
- Laurie DJ, Seeburg PH and Wisden W (1992b) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* **12**, 1063-1076.
- Lavecchia A, Cosconati S and Novellino E (2005) Architecture of the human urotensin II receptor: comparison of the binding domains of peptide and non-peptide urotensin II agonists. *J Med Chem* **48**, 2480-2492.
- Lavoie AM, Tingey JJ, Harrison NL, Pritchett DB and Twyman RE (1997) Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophys J* **73**, 2518-2526.
- Lawler OA, Miggins SM and Kinsella BT (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J Biol Chem* **276**, 33596-33607.
- Le Goascogne C, Robel P, Gouezou M, Sananes N, Baulieu EE and Waterman M (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450scc in rat brain. *Science* **237**, 1212-1215.
- Le Mevel JC, Olson KR, Conklin D, Waugh D, Smith DD, Vaudry H and Conlon JM (1996) Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol* **271**, R1335-1343.
- Lederis K (1969) Teleostean urophysis: stimulation of contractions of bladder of the trout *Salmo gairdnerii*. *Science* **163**, 1327-1328.
- Lederis K (1970) Teleost urophysis. II. Biological characterization of the bladder-contracting activity. *Gen Comp Endocrinol* **14**, 427-437.
- Lederis K (1970) Teleost urophysis. 1. Bioassay of an active urophysial principle on the isolated urinary bladder of the Rainbow Trout, *Salmo gairdnerii*. *Gen Comp Endocrinol* **14**, 417-426.
- Leidenheimer NJ (1996) Effect of PKG activation on recombinant GABAA receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **42**, 131-134.

- Leifeld L, Clemens C, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T and Spengler U (2009) Expression of Urotensin II and Its Receptor in Human Liver Cirrhosis and Fulminant Hepatic Failure. *Dig Dis Sci.*
- Leil TA, Chen ZW, Chang CS and Olsen RW (2004) GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* **24**, 11429-11438.
- Leonard ST, Gerak LR, Delatte MS, Moerschbaecher JM and Winsauer PJ (2009) Relative potency and effectiveness of flunitrazepam, ethanol, and beta-CCE for disrupting the acquisition and retention of response sequences in rats. *Behav Pharmacol* **20**, 33-44.
- Lescot E, Sopkova-de Oliveira Santos J, Dubessy C, Oulyadi H, Lesnard A, Vaudry H, Bureau R and Rault S (2007) Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonists of human urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human urotensin-II and URP. *J Chem Inf Model* **47**, 602-612.
- Lescot E, Sopkova-de Oliveira Santos J, Colloc'h N, Rodrigo J, Milazzo-Segalas I, Bureau R and Rault S (2008a) Three-dimensional model of the human urotensin-II receptor: docking of human urotensin-II and nonpeptide antagonists in the binding site and comparison with an antagonist pharmacophore model. *Proteins* **73**, 173-184.
- Lescot E, Bureau R and Rault S (2008b) Nonpeptide Urotensin-II receptor agonists and antagonists: review and structure-activity relationships. *Peptides* **29**, 680-690.
- Leslie SJ, Denvir M, Webb DJ (2000) Human urotensin II causes vasoconstriction in the human skin microcirculation. *Circulation* **102**, Suppl. II, 542.
- Levi S, Logan SM, Tovar KR and Craig AM (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J Neurosci* **24**, 207-217.
- Li M and De Blas AL (1997) Coexistence of two beta subunit isoforms in the same gamma-aminobutyric acid type A receptor. *J Biol Chem* **272**, 16564-16569.
- Li X and Pearce RA (2000) Effects of halothane on GABA(A) receptor kinetics: evidence for slowed agonist unbinding. *J Neurosci* **20**, 899-907.
- Li X, Czajkowski C and Pearce RA (2000) Rapid and direct modulation of GABAA receptors by halothane. *Anesthesiology* **92**, 1366-1375.
- Liang J, Zhang N, Cagetti E, Houser CR, Olsen RW and Spigelman I (2006) Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci* **26**, 1749-1758.
- Liao M, Sonner JM, Jurd R, Rudolph U, Borghese CM, Harris RA, Laster MJ and Eger EI, 2nd (2005) Beta3-containing gamma-aminobutyric acidA receptors are not major targets

- for the amnesic and immobilizing actions of isoflurane. *Anesth Analg* **101**, 412-418, table of contents.
- Lin LH, Chen LL, Zirrolli JA and Harris RA (1992) General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acidA receptors expressed by Xenopus oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther* **263**, 569-578.
- Lin YF, Browning MD, Dudek EM and Macdonald RL (1994) Protein kinase C enhances recombinant bovine alpha 1 beta 1 gamma 2L GABAA receptor whole-cell currents expressed in L929 fibroblasts. *Neuron* **13**, 1421-1431.
- Lin YF, Angelotti TP, Dudek EM, Browning MD and Macdonald RL (1996) Enhancement of recombinant alpha 1 beta 1 gamma 2L gamma-aminobutyric acidA receptor whole-cell currents by protein kinase C is mediated through phosphorylation of both beta 1 and gamma 2L subunits. *Mol Pharmacol* **50**, 185-195.
- Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J Biol Chem* **272**, 31051-31057.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K and Iida M (2003) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* **26**, 839-845.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I and Iida M (2003) Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *J Hypertens* **21**, 159-165.
- Lin L, Ding WH, Jiang W, Zhang YG, Qi YF, Yuan WJ and Tang CS (2004) Urotensin-II activates L-arginine/nitric oxide pathway in isolated rat aortic adventitia. *Peptides* **25**, 1977-1984.
- Lindquist CE, Laver DR and Birnir B (2005) The mechanism of SR95531 inhibition at GABA receptors examined in human alpha1beta1 and alpha1beta1gamma2S receptors. *J Neurochem* **94**, 491-501.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Jr., Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF and Caskey CT (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 174-178.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT and Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* **403**, 274-280.
- Liu JC, Chen CH, Chen JJ and Cheng TH (2009) Urotensin II induces rat cardiomyocyte

- hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol* **76**, 1186-1195.
- Lobo IA and Harris RA (2008) GABA(A) receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* **90**, 90-94.
- Loebrich S, Bahring R, Katsuno T, Tsukita S and Kneussel M (2006) Activated radixin is essential for GABAA receptor alpha5 subunit anchoring at the actin cytoskeleton. *Embo J* **25**, 987-999.
- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H and Rudolph U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**, 131-134.
- Lu Y, Zou CJ, Huang DW and Tang CS (2002) Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas. *Peptides* **23**, 1631-1635.
- Luddens H, Pritchett DB, Kohler M, Killisch I, Keinanen K, Monyer H, Sprengel R and Seburg PH (1990) Cerebellar GABAA receptor selective for a behavioural alcohol antagonist. *Nature* **346**, 648-651.
- Luddens H, Killisch I and Seburg PH (1991) More than one alpha variant may exist in a GABAA/benzodiazepine receptor complex. *J Recept Res* **11**, 535-551.
- Lukas RJ and Bencherif M (2006) Recent developments in nicotinic acetylcholine receptor biology. Arias, H. (Ed.), Biological and Biophysical Aspects of Ligand-Gated Ion Channel Receptor Superfamilies. *Research Signpost*, Trivandrum, 27-59.
- Luscher B and Keller CA (2004) Regulation of GABAA receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* **102**, 195-221.
- Luu T, Cromer B, Gage PW and Tierney ML (2005) A role for the 2' residue in the second transmembrane helix of the GABA A receptor gamma2S subunit in channel conductance and gating. *J Membr Biol* **205**, 17-28.
- Luu T, Gage PW and Tierney ML (2006) GABA increases both the conductance and mean open time of recombinant GABAA channels co-expressed with GABARAP. *J Biol Chem* **281**, 35699-35708.
- Lydiard RB (2003) The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* **64 Suppl 3**, 21-27.

✉ M ☎

- Ma JY and Narahashi T (1993) Differential modulation of GABA_A receptor-channel complex by polyvalent cations in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* **607**, 222-232.
- Ma W and Barker JL (1995) Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABA_A receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J Neurosci* **15**, 2547-2560.
- MacDonald RL and Twyman RE (1992) Kinetic properties and regulation of GABA_A receptor channels. *Ion Channels* **3**, 315-343.
- Macdonald RL and Olsen RW (1994) GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* **17**, 569-602.
- MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I and Pollard K (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* **130**, 201-204.
- Maguire JJ, Kuc RE and Davenport AP (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* **131**, 441-446.
- Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ and Davenport AP (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* **25**, 1767-1774.
- Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ and Davenport AP (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* **29**, 735-742.
- Maitra R and Reynolds JN (1998) Modulation of GABA(A) receptor function by neuroactive steroids: evidence for heterogeneity of steroid sensitivity of recombinant GABA(A) receptor isoforms. *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 909-920.
- Malagon MM, Molina M, Gahete MD, Duran-Prado M, Martinez-Fuentes AJ, Alcain FJ, Tonon MC, Leprince J, Vaudry H, Castano JP and Vazquez-Martinez R (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide activate somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Peptides* **29**, 711-720.
- Malizia AL and Nutt DJ (1995) The effects of flumazenil in neuropsychiatric disorders. *Clin Neuropharmacol* **18**, 215-232.

- Malizia AL (2002) Receptor binding and drug modulation in anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**, 567-574.
- Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Tripepi G and Zoccali C (2005) Urotensin II in end-stage renal disease: an inverse correlate of sympathetic function and cardiac natriuretic peptides. *J Nephrol* **18**, 727-732.
- Malminniemi O and Korpi ER (1989) Diazepam-insensitive [³H]Ro 15-4513 binding in intact cultured cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* **169**, 53-60.
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P and et al. (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* **29**, 335-344.
- Marco J, Egido EM, Hernandez R and Silvestre RA (2008) Evidence for endogenous urotensin-II as an inhibitor of insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Peptides* **29**, 852-858.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM and Julius D (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **254**, 432-437.
- Marshall WS and Bern HA (1981) Active chloride transport by the skin of a marine teleost is stimulated by urotensin I and inhibited by urotensin II. *Gen Comp Endocrinol* **43**, 484-491.
- Martin JR, Pieri L, Bonetti EP, Schaffner R, Burkard WP, Cumin R and Haefely WE (1988) Ro 16-6028: a novel anxiolytic acting as a partial agonist at the benzodiazepine receptor. *Pharmacopsychiatry* **21**, 360-362.
- Martinez-Torres A, Demuro A and Miledi R (2000) GABA_A 1/GABA_Aalpha 1 receptor chimeras to study receptor desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3562-3566.
- Martyniuk CJ, Aris-Brosou S, Drouin G, Cahn J and Trudeau VL (2007) Early evolution of ionotropic GABA receptors and selective regimes acting on the mammalian-specific theta and epsilon subunits. *PLoS One* **2**, e894.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H and Tonon MC (2005) Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem* **94**, 561-571.
- Mathers DA and Barker JL (1981) GABA- and glycine-induced Cl⁻ channels in cultured mouse spinal neurons require the same energy to close. *Brain Res* **224**, 441-445.
- Mathie A, Sutton GL, Clarke CE and Veale EL (2006) Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol Ther* **111**, 567-

583.

- Mathys B, Mueller C, Scherz M, Weller T, Clozel M, Velker J, et al. Actelion Pharmaceuticals Ltd. (assignee). Preparation of pyridinyl ureas as urotensin II antagonists. *PCT Int Appl.*; 2005 (WO2005030209).
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T and Fujino M (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes anxiogenic-like behaviors in rodents. *Neurosci Lett* **358**, 99-102.
- Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N and Hirata Y (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *J Hypertens* **19**, 2185-2190.
- Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N and Hirata Y (2003) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* **144**, 1825-1831.
- McDonald BJ and Moss SJ (1994) Differential phosphorylation of intracellular domains of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **269**, 18111-18117.
- McDonald BJ and Moss SJ (1997) Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology* **36**, 1377-1385.
- McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ and Smart TG (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABA(A) receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* **1**, 23-28.
- McKernan RM and Whiting PJ (1996) Which GABA(A)-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* **19**, 139-143.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR and Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* **3**, 587-592.
- McKhann GM, 2nd, D'Ambrosio R and Janigro D (1997) Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes. *J Neurosci* **17**, 6850-6863.

- McMaster D and Lederis K (1983) Isolation and amino acid sequence of two urotensin II peptides from Catostomus commersoni urophyses. *Peptides* **4**, 367-373.
- McMaster D, Belenky MA, Polenov AL and Lederis K (1992) Isolation and amino acid sequence of urotensin II from the sturgeon Acipenser ruthenus. *Gen Comp Endocrinol* **87**, 275-285.
- Mehta AK, Marutha Ravindran CR and Ticku MK (2007) Low concentrations of ethanol do not affect radioligand binding to the delta-subunit-containing GABA_A receptors in the rat brain. *Brain Res* **1165**, 15-20.
- Mennerick S, He Y, Jiang X, Manion BD, Wang M, Shute A, Benz A, Evers AS, Covey DF and Zorumski CF (2004) Selective antagonism of 5alpha-reduced neurosteroid effects at GABA(A) receptors. *Mol Pharmacol* **65**, 1191-1197.
- Mertens S, Benke D and Mohler H (1993) GABA_A receptor populations with novel subunit combinations and drug binding profiles identified in brain by alpha 5- and delta-subunit-specific immunopurification. *J Biol Chem* **268**, 5965-5973.
- Michel JJ and Scott JD (2002) AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 235-257.
- Mihalek RM, Banerjee PK, Korpi ER, Quinlan JJ, Firestone LL, Mi ZP, Lagenaur C, Tretter V, Sieghart W, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS, Guidotti A, Spigelman I, Li Z, DeLorey TM, Olsen RW and Homanics GE (1999) Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12905-12910.
- Mihic SJ, Whiting PJ, Klein RL, Wafford KA and Harris RA (1994a) A single amino acid of the human gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma 2 subunit determines benzodiazepine efficacy. *J Biol Chem* **269**, 32768-32773.
- Mihic SJ, McQuilkin SJ, Eger EI, 2nd, Ionescu P and Harris RA (1994b) Potentiation of gamma-aminobutyric acid type A receptor-mediated chloride currents by novel halogenated compounds correlates with their abilities to induce general anesthesia. *Mol Pharmacol* **46**, 851-857.
- Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA and Harrison NL (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **389**, 385-389.
- Miko A, Werby E, Sun H, Healey J and Zhang L (2004) A TM2 residue in the beta1 subunit determines spontaneous opening of homomeric and heteromeric gamma-aminobutyric acid-gated ion channels. *J Biol Chem* **279**, 22833-22840.
- Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J and Deuchars SA (2004) Evidence for

- inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci* **24**, 7241-7250.
- Minier F and Sigel E (2004) Techniques: Use of concatenated subunits for the study of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 499-503.
- Miralles CP, Li M, Mehta AK, Khan ZU and De Blas AL (1999) Immunocytochemical localization of the beta(3) subunit of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor in the rat brain. *J Comp Neurol* **413**, 535-548.
- Misgeld U, Bijak M and Jarolimek W (1995) A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **46**, 423-462.
- Mitchell EA, Herd MB, Gunn BG, Lambert JJ and Belelli D (2008) Neurosteroid modulation of GABAA receptors: molecular determinants and significance in health and disease. *Neurochem Int* **52**, 588-595.
- Mizokami A, Kanematsu T, Ishibashi H, Yamaguchi T, Tanida I, Takenaka K, Nakayama KI, Fukami K, Takenawa T, Kominami E, Moss SJ, Yamamoto T, Nabekura J and Hirata M (2007) Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* **27**, 1692-1701.
- Mohler H, Fritschy JM, Lüscher B, Rudolph U, Benson J and Benke D (1996) The GABAA receptors. From subunits to diverse functions. *Ion Channels* **4**, 89-113.
- Mokrab Y, Bavro VN, Mizuguchi K, Todorov NP, Martin IL, Dunn SM, Chan SL and Chau PL (2007) Exploring ligand recognition and ion flow in comparative models of the human GABA type A receptor. *J Mol Graph Model* **26**, 760-774.
- Monaco AP, Baghdoyan HA, Nelson JP and Hobson JA (1984) Cortical wave amplitude and eye movement direction are correlated in REM sleep but not in waking. *Arch Ital Biol* **122**, 213-223.
- Moody EJ, Suzdak PD, Paul SM and Skolnick P (1988) Modulation of the benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor chloride channel complex by inhalation anesthetics. *J Neurochem* **51**, 1386-1393.
- Moragues N, Ciofi P, Lafon P, Odessa MF, Tramu G and Garret M (2000) cDNA cloning and expression of a gamma-aminobutyric acid A receptor epsilon-subunit in rat brain. *Eur J Neurosci* **12**, 4318-4330.
- Moragues N, Ciofi P, Tramu G and Garret M (2002) Localisation of GABA(A) receptor epsilon-subunit in cholinergic and aminergic neurones and evidence for co-distribution with the theta-subunit in rat brain. *Neuroscience* **111**, 657-669.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y,

- Kurokawa T, Onda H, Nishimura O and Fujino M (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 123-129.
- Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K and Totsune K (2009) Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* **30**, 400-408.
- Morris KD, Moorefield CN and Amin J (1999) Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol* **56**, 752-759.
- Morris KD and Amin J (2004) Insight into the mechanism of action of neuroactive steroids. *Mol Pharmacol* **66**, 56-69.
- Morrow AL, Pace JR, Purdy RH and Paul SM (1990) Characterization of steroid interactions with gamma-aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol Pharmacol* **37**, 263-270.
- Moss SJ, Doherty CA and Huganir RL (1992) Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the beta 1, gamma 2S, and gamma 2L subunits of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *J Biol Chem* **267**, 14470-14476.
- Moss SJ, Gorrie GH, Amato A and Smart TG (1995) Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* **377**, 344-348.
- Moss SJ and Smart TG (1996) Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol* **39**, 1-52.
- Moykkynen T, Uusi-Oukari M, Heikkila J, Lovinger DM, Luddens H and Korpi ER (2001) Magnesium potentiation of the function of native and recombinant GABA(A) receptors. *Neuroreport* **12**, 2175-2179.
- Muller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Mohler H and Kettenmann H (1994) Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* **14**, 2503-2514.
- Murthy KS and Makhlof GM (1996a) Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Mol Pharmacol* **50**, 870-877.
- Murthy KS, Coy DH and Makhlof GM (1996b) Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *J Biol Chem* **271**, 23458-23463.

N

- Naga Prasad SV, Jayatilleke A, Madamanchi A and Rockman HA (2005) Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **7**, 785-796.
- Nakagawa T, Yabe T and Schwartz JP (2005) Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiol Dis* **20**, 275-282.
- Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K and Imai Y (2008) Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* **29**, 801-808.
- Narahashi T, Ma JY, Arakawa O, Reuveny E and Nakahiro M (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol* **14**, 599-621.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL and Barnard EA (1994) Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* **62**, 815-818.
- Neelands TR and Macdonald RL (1999) Incorporation of the pi subunit into functional gamma-aminobutyric Acid(A) receptors. *Mol Pharmacol* **56**, 598-610.
- Neelands TR, Fisher JL, Bianchi M and Macdonald RL (1999) Spontaneous and gamma-aminobutyric acid (GABA)-activated GABA(A) receptor channels formed by epsilon subunit-containing isoforms. *Mol Pharmacol* **55**, 168-178.
- Neher E and Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Nemeroff CB (2003) The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* **37**, 133-146.
- Newell JG and Czajkowski C (2003) The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J Biol Chem* **278**, 13166-13172.
- Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB and Davies JE (2002) Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* **106**, 2877-2880.
- Ninan PT, Insel TM, Cohen RM, Cook JM, Skolnick P and Paul SM (1982) Benzodiazepine receptor-mediated experimental "anxiety" in primates. *Science* **218**, 1332-1334.

- Nishikawa K, Jenkins A, Paraskevakis I and Harrison NL (2002) Volatile anesthetic actions on the GABA_A receptors: contrasting effects of alpha 1(S270) and beta 2(N265) point mutations. *Neuropharmacology* **42**, 337-345.
- Nishikawa K and Harrison NL (2003) The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits. *Anesthesiology* **99**, 678-684.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T and Numa S (1983) Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* **301**, 251-255.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP and Civelli O (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* **1**, 383-385.
- Nusser Z, Sieghart W and Somogyi P (1998) Segregation of different GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* **18**, 1693-1703.
- Nusser Z, Sieghart W and Mody I (1999) Differential regulation of synaptic GABA_A receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J Physiol* **521 Pt 2**, 421-435.
- Nymann-Andersen J, Wang H, Chen L, Kittler JT, Moss SJ and Olsen RW (2002a) Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors. *J Neurochem* **80**, 815-823.
- Nymann-Andersen J, Wang H and Olsen RW (2002b) Biochemical identification of the binding domain in the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) mediating dimer formation. *Neuropharmacology* **43**, 476-481.



- Ogris W, Poltl A, Hauer B, Ernst M, Oberto A, Wulff P, Hoger H, Wisden W and Sieghart W (2004) Affinity of various benzodiazepine site ligands in mice with a point mutation in the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Biochem Pharmacol* **68**, 1621-1629.
- Olkkola KT and Ahonen J (2008) Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol*, 335-360.
- Olsen RW, Hanchar HJ, Meera P and Wallner M (2007) GABA_A receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol* **41**, 201-209.

- Olsen RW and Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* **60**, 243-260.
- Olsen RW and Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141-148.
- O'Mara M, Cromer B, Parker M and Chung SH (2005) Homology model of the GABAA receptor examined using Brownian dynamics. *Biophys J* **88**, 3286-3299.
- O'Meara GF, Newman RJ, Fradley RL, Dawson GR and Reynolds DS (2004) The GABA-A beta3 subunit mediates anaesthesia induced by etomidate. *Neuroreport* **15**, 1653-1656.
- Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD and Thomas WG (2004) Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol* **18**, 2344-2354.
- Ono T, Kawaguchi Y, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA, Guerrini R, Calo G and Hirota K (2008) Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett* **440**, 275-279.
- Orser BA (2006) Extrasynaptic GABAA receptors are critical targets for sedative-hypnotic drugs. *J Clin Sleep Med* **2**, S12-18.
- Ortells MO and Lunt GG (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* **18**, 121-127.
- O'Shea SM and Harrison NL (2000) Arg-274 and Leu-277 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 2 subunit define agonist efficacy and potency. *J Biol Chem* **275**, 22764-22768.
- O'Shea SM, Williams CA and Jenkins A (2009) Inverse effects on gating and modulation caused by a mutation in the M2-M3 Linker of the GABA(A) receptor gamma subunit. *Mol Pharmacol* **76**, 641-651.



- Palasz A and Czekaj P (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochim Pol* **47**, 1107-1114.
- Pan Y and Qian H (2005) Interactions between rho and gamma2 subunits of the GABA receptor. *J Neurochem* **94**, 482-490.
- Park-Chung M, Malayev A, Purdy RH, Gibbs TT and Farb DH (1999) Sulfated and unsulfated steroids modulate gamma-aminobutyric acidA receptor function through

- distinct sites. *Brain Res* **830**, 72-87.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P and Maggi CA (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* **140**, 1155-1158.
- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS and Bern HA (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5021-5024.
- Pelham HR (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 1-23.
- Pelletier G, Lihrmann I, Dubessy C, Luu-The V, Vaudry H and Labrie F (2005) Androgenic down-regulation of urotensin II precursor, urotensin II-related peptide precursor and androgen receptor mRNA in the mouse spinal cord. *Neuroscience* **132**, 689-696.
- Peng Z, Hauer B, Mihalek RM, Homanics GE, Sieghart W, Olsen RW and Houser CR (2002) GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain. *J Comp Neurol* **446**, 179-197.
- Perkins TD, Bansal S and Barlow DJ (1990) Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochem Soc Trans* **18**, 918-919.
- Persohn E, Malherbe P and Richards JG (1992) Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* **326**, 193-216.
- Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ and Turner AJ (1988) Modulation of the GABAA receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol* **94**, 1257-1269.
- Pfeiffer F, Graham D and Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* **257**, 9389-9393.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W and Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**, 815-850.
- Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD and Mody I (1999) Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**, 674-683.
- Popovici C, Leveugle M, Birnbaum D and Coulier F (2001) Coparalogy: physical and functional clusterings in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 362-370.
- Porter NM, Twyman RE, Uhler MD and Macdonald RL (1990) Cyclic AMP-dependent protein kinase decreases GABAA receptor current in mouse spinal neurons. *Neuron* **5**,

- 789-796.
- Potokar J, Coupland N, Glue P, Groves S, Malizia A, Bailey J, Wilson S and Nutt D (1997) Flumazenil in alcohol withdrawal: a double-blind placebo-controlled study. *Alcohol Alcohol* **32**, 605-611.
- Poulsen CF, Christjansen KN, Hastrup S and Hartvig L (2000) Identification and cloning of a gamma 3 subunit splice variant of the human GABA(A) receptor. *Brain Res Mol Brain Res* **78**, 201-203.
- Poulter MO, Barker JL, O'Carroll AM, Lolait SJ and Mahan LC (1992) Differential and transient expression of GABAA receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J Neurosci* **12**, 2888-2900.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Gorman CM, Kettenmann H, Seeburg PH and Schofield PR (1988) Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABAA receptor subunits. *Science* **242**, 1306-1308.
- Pritchett DB, Luddens H and Seeburg PH (1989) Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* **245**, 1389-1392.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J and Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**, 1-20.
- Prosser HC, Leprince J, Vaudry H, Richards AM, Forster ME and Pemberton CJ (2006) Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts. *Peptides* **27**, 3261-3268.
- Protopopov A, Kashuba V, Podowski R, Gizatullin R, Sonnhammer E, Wahlestedt C and Zabarovsky ER (2000) Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **88**, 312-313.
- Proulx CD, Simaan M, Escher E, Laporte SA, Guillemette G and Leduc R (2005) Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization. *Biochem J* **385**, 115-123.
- Proulx CD, Holleran BJ, Boucard AA, Escher E, Guillemette G and Leduc R (2008) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol Pharmacol* **74**, 552-561.
- Pryor PR, Mullock BM, Bright NA, Gray SR and Luzio JP (2000) The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol* **149**, 1053-1062.
- Puia G, Santi MR, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH and Costa E (1990) Neurosteroids act on recombinant human GABAA receptors. *Neuron* **4**, 759-765.

Puia G, Vicini S, Seeburg PH and Costa E (1991) Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Mol Pharmacol* **39**, 691-696.

Puia G, Ducic I, Vicini S and Costa E (1993) Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA_A receptor subunit composition? *Receptors Channels* **1**, 135-142.



Qi J, Du J, Tang X, Li J, Wei B and Tang C (2004) The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting. *Heart Vessels* **19**, 81-88.

Qi JS, Minor LK, Smith C, Hu B, Yang J, Andrade-Gordon P and Damiano B (2005) Characterization of functional urotensin II receptors in human skeletal muscle myoblasts: comparison with angiotensin II receptors. *Peptides* **26**, 683-690.

Qian H and Ripps H (1999) Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA rho- and gamma 2-subunits. *Proc Biol Sci* **266**, 2419-2425.

Quattrochi JJ, Mamelak AN, Madison RD, Macklis JD and Hobson JA (1989) Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. *Science* **245**, 984-986.

Quinlan JJ, Homanics GE and Firestone LL (1998) Anesthesia sensitivity in mice that lack the beta3 subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Anesthesiology* **88**, 775-780.

Quirk K, Gillard NP, Ragan CI, Whiting PJ and McKernan RM (1994) gamma-Aminobutyric acid type A receptors in the rat brain can contain both gamma 2 and gamma 3 subunits, but gamma 1 does not exist in combination with another gamma subunit. *Mol Pharmacol* **45**, 1061-1070.



Rabow LE, Russek SJ and Farb DH (1995) From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA_A receptor research. *Synapse* **21**, 189-274.

Ranna M, Sinkkonen ST, Moykkynen T, Usi-Oukari M and Korpi ER (2006) Impact of epsilon and theta subunits on pharmacological properties of alpha3beta1 GABA_A

- receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Pharmacol* **6**, 1.
- Rathenberg J, Kittler JT and Moss SJ (2004) Palmitoylation regulates the clustering and cell surface stability of GABA_A receptors. *Mol Cell Neurosci* **26**, 251-257.
- Reddy DS (2003) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol* **15**, 197-234.
- Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, Myers J, Sur C, Howell O, Rutter AR, Atack J, Macaulay AJ, Hadingham KL, Hutson PH, Belelli D, Lambert JJ, Dawson GR, McKernan R, Whiting PJ and Wafford KA (2003) Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J Neurosci* **23**, 8608-8617.
- Rho JM, Donevan SD and Rogawski MA (1996) Direct activation of GABA_A receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* **497 (Pt 2)**, 509-522.
- Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S and Yandle TG (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* **360**, 545-546.
- Riquelme R, Miralles CP and De Blas AL (2002) Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci* **22**, 10720-10730.
- Riss J, Cloyd J, Gates J and Collins S (2008) Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand* **118**, 69-86.
- Rivas RJ, Nishioka RS and Bern HA (1986) In vitro effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol* **63**, 245-251.
- Robello M, Amico C and Cupello A (1993) Regulation of GABA_A receptor in cerebellar granule cells in culture: differential involvement of kinase activities. *Neuroscience* **53**, 131-138.
- Robello M, Amico C, Bucossi G, Cupello A, Rapallino MV and Thellung S (1996) Nitric oxide and GABA_A receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. *Neuroscience* **74**, 99-105.
- Rogers CJ, Twyman RE and Macdonald RL (1994) Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABA_A receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* **475**, 69-82.
- Rong J, Li SH and Li XJ (2007) Regulation of intracellular HAP1 trafficking. *J Neurosci Res* **85**, 3025-3029.
- Rosowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R and Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and

- Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **438**, 159-170.
- Rowlett JK, Platt DM, Lelas S, Atack JR and Dawson GR (2005) Different GABA_A receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 915-920.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H and Mohler H (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* **401**, 796-800.
- Rudolph U and Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* **5**, 709-720.
- Rudolph U and Mohler H (2004) Analysis of GABA_A receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 475-498.
- Rupprecht R and Holsboer F (1999) Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci* **22**, 410-416.
- Russell FD, Molenaar P and O'Brien DM (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *Br J Pharmacol* **132**, 5-9.
- Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P and Molenaar P (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1576-1581.
- Russell FD, Kearns P, Toth I and Molenaar P (2004) Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 209-214.
- Russell FD and Molenaar P (2004) Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovasc Res* **63**, 673-681.



- Saetrum Opggaard O, Nothacker H, Ehlert FJ and Krause DN (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol* **406**, 265-271.
- Sakmann B, Hamill OP and Bormann J (1983) Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitter GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J Neural Transm Suppl* **18**, 83-95.
- Saliba RS, Michels G, Jacob TC, Pangalos MN and Moss SJ (2007) Activity-dependent

- ubiquitination of GABA(A) receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *J Neurosci* **27**, 13341-13351.
- Saliba RS, Pangalos M and Moss SJ (2008) The ubiquitin-like protein Plic-1 enhances the membrane insertion of GABAA receptors by increasing their stability within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **283**, 18538-18544.
- Sancar F, Erickson SS, Kucken AM, Teissere JA and Czajkowski C (2007) Structural determinants for high-affinity zolpidem binding to GABA-A receptors. *Mol Pharmacol* **71**, 38-46.
- Sanger DJ, Morel E and Perrault G (1996) Comparison of the pharmacological profiles of the hypnotic drugs, zaleplon and zolpidem. *Eur J Pharmacol* **313**, 35-42.
- Sanger DJ, Griebel G, Perrault G, Claustre Y and Schoemaker H (1999) Discriminative stimulus effects of drugs acting at GABA(A) receptors: differential profiles and receptor selectivity. *Pharmacol Biochem Behav* **64**, 269-273.
- Sanna E, Murgia A, Casula A, Usala M, Maciocco E, Tuligi G and Biggio G (1996) Direct activation of GABAA receptors by loreclezole, an anticonvulsant drug with selectivity for the beta-subunit. *Neuropharmacology* **35**, 1753-1760.
- Sanna E, Murgia A, Casula A and Biggio G (1997) Differential subunit dependence of the actions of the general anesthetics alphaxalone and etomidate at gamma-aminobutyric acid type A receptors expressed in Xenopus laevis oocytes. *Mol Pharmacol* **51**, 484-490.
- Santhakumar V, Wallner M and Otis TS (2007) Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition. *Alcohol* **41**, 211-221.
- Sarto I, Wabnigger L, Dogl E and Sieghart W (2002a) Homologous sites of GABA(A) receptor alpha(1), beta(3) and gamma(2) subunits are important for assembly. *Neuropharmacology* **43**, 482-491.
- Sarto I, Klausberger T, Ehya N, Mayer B, Fuchs K and Sieghart W (2002b) A novel site on gamma 3 subunits important for assembly of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* **277**, 30656-30664.
- Sarto-Jackson I, Ramerstorfer J, Ernst M and Sieghart W (2006) Identification of amino acid residues important for assembly of GABA receptor alpha1 and gamma2 subunits. *J Neurochem* **96**, 983-995.
- Sarto-Jackson I, Furtmueller R, Ernst M, Huck S and Sieghart W (2007) Spontaneous cross-link of mutated alpha1 subunits during GABA(A) receptor assembly. *J Biol Chem* **282**, 4354-4363.
- Sarto-Jackson I and Sieghart W (2008) Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol* **25**, 302-310.

- Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P and Loirand G (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* **88**, 1102-1104.
- Savic MM, Obradovic DI, Ugresic ND, Cook JM, Yin W, Van Linn M and Bokonjic DR (2006) Benzodiazepine site inverse agonists and locomotor activity in rats: bimodal and biphasic influence. *Pharmacol Biochem Behav* **84**, 35-42.
- Sawada M and Ichinose M (1999) Potentiation of GABA(A) receptor-mediated Cl-current by urotensin peptides in identified Aplysia neurons. *J Neurosci Res* **56**, 547-552.
- Saxena NC and Macdonald RL (1994) Assembly of GABAA receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci* **14**, 7077-7086.
- Saxena NC and Macdonald RL (1996) Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol Pharmacol* **49**, 567-579.
- Saxena NC, Neelands TR and MacDonald RL (1997) Contrasting actions of lanthanum on different recombinant gamma-aminobutyric acid receptor isoforms expressed in L929 fibroblasts. *Mol Pharmacol* **51**, 328-335.
- Scheffer IE and Berkovic SF (2003) The genetics of human epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 428-433.
- Scheller M and Forman SA (2002) Coupled and uncoupled gating and desensitization effects by pore domain mutations in GABA(A) receptors. *J Neurosci* **22**, 8411-8421.
- Schluter H, Jankowski J, Rykl J, Thiemann J, Belgardt S, Zidek W, Wittmann B and Pohl T (2003) Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system. *Anal Bioanal Chem* **377**, 1102-1107.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA and et al. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* **328**, 221-227.
- Schumacher M, Robert F and Baulieu EE (1999) [Neurosteroids: trophic effects in the nervous system]. *J Soc Biol* **193**, 285-292.
- Schwartz RD, Wagner JP, Yu X and Martin D (1994) Bidirectional modulation of GABA-gated chloride channels by divalent cations: inhibition by Ca²⁺ and enhancement by Mg²⁺. *J Neurochem* **62**, 916-922.
- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W and Sperk G (2001) Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* **433**, 526-549.

- Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Bletiere D, Loirand G and Pacaud P (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol* **179**, 901-909.
- Shader RI and Greenblatt DJ (1993) Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *N Engl J Med* **328**, 1398-1405.
- Sharonova IN, Vorobjev VS and Haas HL (2000) Interaction between copper and zinc at GABA(A) receptors in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Br J Pharmacol* **130**, 851-856.
- Shen W, Mennerick S, Covey DF and Zorumski CF (2000) Pregnenolone sulfate modulates inhibitory synaptic transmission by enhancing GABA(A) receptor desensitization. *J Neurosci* **20**, 3571-3579.
- Sheng G, Chang GQ, Lin JY, Yu ZX, Fang ZH, Rong J, Lipton SA, Li SH, Tong G, Leibowitz SF and Li XJ (2006) Hypothalamic huntingtin-associated protein 1 as a mediator of feeding behavior. *Nat Med* **12**, 526-533.
- Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH and Giard A (2002) Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *J Histochem Cytochem* **50**, 885-889.
- Shingai R, Sutherland ML and Barnard EA (1991) Effects of subunit types of the cloned GABAA receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmacol* **206**, 77-80.
- Sidharta PN, Wagner FD, Bohnemeier H, Jungnik A, Halabi A, Krahenbuhl S, Chadha-Boreham H and Dingemanse J (2006) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clin Pharmacol Ther* **80**, 246-256.
- Sidharta PN, Rave K, Heinemann L, Chiossi E, Krahenbuhl S and Dingemanse J (2009) Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* **68**, 502-510.
- Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**, 181-234.
- Sieghart W and Sperk G (2002) Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* **2**, 795-816.
- Siegwart R, Jurd R and Rudolph U (2002) Molecular determinants for the action of general anesthetics at recombinant alpha(2)beta(3)gamma(2)gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Neurochem* **80**, 140-148.
- Sigel E and Barnard EA (1984) A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex. Improved purification with preservation of

- regulatory sites and their interactions. *J Biol Chem* **259**, 7219-7223.
- Sigel E, Baur R, Malherbe P and Mohler H (1989) The rat beta 1-subunit of the GABA_A receptor forms a picrotoxin-sensitive anion channel open in the absence of GABA. *FEBS Lett* **257**, 377-379.
- Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H and Malherbe P (1990) The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron* **5**, 703-711.
- Sigel E, Baur R and Malherbe P (1991) Activation of protein kinase C results in down-modulation of different recombinant GABA_A-channels. *FEBS Lett* **291**, 150-152.
- Sigel E, Baur R, Kellenberger S and Malherbe P (1992) Point mutations affecting antagonist affinity and agonist dependent gating of GABA_A receptor channels. *Embo J* **11**, 2017-2023.
- Sigel E, Buhr A and Baur R (1999) Role of the conserved lysine residue in the middle of the predicted extracellular loop between M2 and M3 in the GABA(A) receptor. *J Neurochem* **73**, 1758-1764.
- Sigel E (2002) Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. *Curr Top Med Chem* **2**, 833-839.
- Silvestre RA, Rodriguez-Gallardo J, Egido EM and Marco J (2001) Inhibition of insulin release by urotensin II--a study on the perfused rat pancreas. *Horm Metab Res* **33**, 379-381.
- Silvestre RA, Egido EM, Hernandez R, Leprince J, Chatenet D, Tollemer H, Chartrel N, Vaudry H and Marco J (2004) Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas. *Eur J Endocrinol* **151**, 803-809.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M and Barnard EA (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* **279**, 41422-41435.
- Sinkkonen ST, Hanna MC, Kirkness EF and Korpi ER (2000) GABA(A) receptor epsilon and theta subunits display unusual structural variation between species and are enriched in the rat locus ceruleus. *J Neurosci* **20**, 3588-3595.
- Sinkkonen ST, Homanics GE and Korpi ER (2003) Mouse models of Angelman syndrome, a neurodevelopmental disorder, display different brain regional GABA(A) receptor alterations. *Neurosci Lett* **340**, 205-208.
- Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW and Velculescu VE (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**,

- 268-274.
- Slany A, Zezula J, Fuchs K and Sieghart W (1995) Allosteric modulation of [³H]flunitrazepam binding to recombinant GABA_A receptors. *Eur J Pharmacol* **291**, 99-105.
- Smart TG, Moss SJ, Xie X and Huganir RL (1991) GABA_A receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br J Pharmacol* **103**, 1837-1839.
- Smith GB and Olsen RW (1994) Identification of a [³H]muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acidA receptor alpha subunit. *J Biol Chem* **269**, 20380-20387.
- Smith TA (2001) Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* **58**, 111-121.
- Smith KR, McAinsh K, Chen G, Arancibia-Carcamo IL, Haucke V, Yan Z, Moss SJ and Kittler JT (2008) Regulation of inhibitory synaptic transmission by a conserved atypical interaction of GABA(A) receptor beta- and gamma-subunits with the clathrin AP2 adaptor. *Neuropharmacology* **55**, 844-850.
- Snead OC, 3rd and Gibson KM (2005) Gamma-hydroxybutyric acid. *N Engl J Med* **352**, 2721-2732.
- Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, Thompson JP, Rowbotham DJ and Lambert DG (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **373**, 148-157.
- Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, Homanics GE, Kendig J, Orser B, Raines DE, Rampil IJ, Trudell J, Vissel B and Eger EI, 2nd (2003) Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* **97**, 718-740.
- Sotiriou E, Papatheodoropoulos C and Angelatou F (2005) Differential expression of gamma-aminobutyric acid--a receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci Res* **82**, 690-700.
- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K and Sieghart W (1997) GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* **80**, 987-1000.
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D and Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *Int J Mol*

- Med **18**, 1107-1112.
- Srinivasan S, Nichols CJ, Lawless GM, Olsen RW and Tobin AJ (1999) Two invariant tryptophans on the alpha1 subunit define domains necessary for GABA(A) receptor assembly. *J Biol Chem* **274**, 26633-26638.
- Stadel JM, Wilson S and Bergsma DJ (1997) Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 430-437.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G and Curro Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* **10**, 2541-2559.
- Sternfeld F, Carling RW, Jolley RA, Ladduwahetty T, Merchant KJ, Moore KW, Reeve AJ, Street LJ, O'Connor D, Sohal B, Atack JR, Cook S, Seabrook G, Wafford K, Tattersall FD, Collinson N, Dawson GR, Castro JL and MacLeod AM (2004) Selective, orally active gamma-aminobutyric acidA alpha5 receptor inverse agonists as cognition enhancers. *J Med Chem* **47**, 2176-2179.
- Study RE and Barker JL (1981) Diazepam and (--)pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7180-7184.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M and Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 860-868.
- Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M and Miyazaki A (2008) Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* **115**, 327-334.
- Sun HX, Du WN, Zuo J, Wu GD, Shi GB, Shen Y, Qiang BQ, Yao ZJ, Hang JM, Wang H, Huang W, Chen Z and Fang FD (2002) [The association of two single nucleotide polymorphisms in PRKCZ and UTS2 respectively with type 2 diabetes in Han people of northern China]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **24**, 223-227.
- Sun C, Sieghart W and Kapur J (2004) Distribution of alpha1, alpha4, gamma2, and delta subunits of GABAA receptors in hippocampal granule cells. *Brain Res* **1029**, 207-216.
- Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong QH, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K and Smith SS (2002) Hormonally regulated alpha(4)beta(2)delta GABA(A) receptors are a target for alcohol. *Nat Neurosci* **5**, 721-722.

T
B
C

- Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M and Thompson DA (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 752-759.
- Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H and Nakashima Y (2003) Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling. *Life Sci* **72**, 1049-1060.
- Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H and Wakabayashi I (2004) Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci* **94**, 376-383.
- Tarui N, Santo T, Mori M, Watanabe H. Takeda Chemical Industries (assignee). Quinoline derivatives as vasoactive agents exhibiting orphan receptor GPR14 protein antagonism. *PCT Int Appl.*; 2001 (WO2001066143).
- Tarui N, Santo T, Watanabe H, Aso K, Miwa T, Takekawa S. Takeda Chemical Industries (assignee). Preparation of biphenylcarboxamide compounds as GPR14 antagonists or somatostatin receptor regulators. *PCT Int Appl.*; 2002a (WO2002000606).
- Tarui N, Santo T, Watanabe H, Aso K, Ishihara Y. Takeda Chemical Industries (assignee). Preparation of 2,3,4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine derivatives as GPR14 antagonists. *PCT Int Appl.*; 2002b (WO2002002530).
- Tatebayashi H, Motomura H and Narahashi T (1998) Alcohol modulation of single GABA(A) receptor-channel kinetics. *Neuroreport* **9**, 1769-1775.
- Tateishi N, Shimoda T, Manako J, Katsumata S, Shinagawa R and Ohno H (2006) Relevance of astrocytic activation to reductions of astrocytic GABA(A) receptors. *Brain Res* **1089**, 79-91.
- Taylor PM, Thomas P, Gorrie GH, Connolly CN, Smart TG and Moss SJ (1999) Identification of amino acid residues within GABA(A) receptor beta subunits that mediate both homomeric and heteromeric receptor expression. *J Neurosci* **19**, 6360-6371.
- Taylor PM, Connolly CN, Kittler JT, Gorrie GH, Hosie A, Smart TG and Moss SJ (2000) Identification of residues within GABA(A) receptor alpha subunits that mediate specific assembly with receptor beta subunits. *J Neurosci* **20**, 1297-1306.
- Teissere JA and Czajkowski C (2001) A (beta)-strand in the (gamma)2 subunit lines the benzodiazepine binding site of the GABA A receptor: structural rearrangements detected during channel gating. *J Neurosci* **21**, 4977-4986.

- Terunuma M, Jang IS, Ha SH, Kittler JT, Kanematsu T, Jovanovic JN, Nakayama KI, Akaike N, Ryu SH, Moss SJ and Hirata M (2004) GABAA receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J Neurosci* **24**, 7074-7084.
- Thode C, Guttinger HR and Darlison MG (2008) Expression of the GABA(A) receptor gamma4-subunit gene in discrete nuclei within the zebra finch song system. *Neuroscience* **157**, 143-152.
- Thomas P, Mortensen M, Hosie AM and Smart TG (2005) Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* **8**, 889-897.
- Thompson SA, Whiting PJ and Wafford KA (1996) Barbiturate interactions at the human GABAA receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br J Pharmacol* **117**, 521-527.
- Thompson SA, Smith MZ, Wingrove PB, Whiting PJ and Wafford KA (1999) Mutation at the putative GABA(A) ion-channel gate reveals changes in allosteric modulation. *Br J Pharmacol* **127**, 1349-1358.
- Thompson SA, Bonnert TP, Cagetti E, Whiting PJ and Wafford KA (2002) Overexpression of the GABA(A) receptor epsilon subunit results in insensitivity to anaesthetics. *Neuropharmacology* **43**, 662-668.
- Thompson JP, Watt P, Sanghavi S, Strupish JW and Lambert DG (2003) A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth Analg* **97**, 1501-1503.
- Thompson AJ and Lummis SC (2006) 5-HT3 receptors. *Curr Pharm Des* **12**, 3615-3630.
- Tostivint H, Joly L, Lihrmann I, Parmentier C, Lebon A, Morisson M, Calas A, Ekker M and Vaudry H (2006) Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2237-2242.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H and Murakami O (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* **358**, 810-811.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S and Murakami O (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* **104**, 1-5.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K and Sieghart W (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci* **17**, 2728-2737.
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN and Moss SJ (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the

- direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* **28**, 1356-1365.
- Trombley PQ (1998) Selective modulation of GABA_A receptors by aluminum. *J Neurophysiol* **80**, 755-761.
- Turner DM, Ransom RW, Yang JS and Olsen RW (1989) Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the gamma-aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 960-966.
- Twyman RE and Macdonald RL (1992) Neurosteroid regulation of GABA_A receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J Physiol* **456**, 215-245.
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE and Krum H (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ Res* **93**, 246-253.

ꝝ U ꝝ

Unwin N (1993) Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* **72 Suppl**, 31-41.

Usui-Oukari M, Makela R, Soini S and Korpi ER (2001) Cation modulation of GABA(A) receptors in brain sections of AT and ANT rats. *Alcohol* **25**, 69-75.

ꝝ V ꝝ

Vafa B and Schofield PR (1998) Heritable mutations in the glycine, GABA_A, and nicotinic acetylcholine receptors provide new insights into the ligand-gated ion channel receptor superfamily. *Int Rev Neurobiol* **42**, 285-332.

Valenzuela CF, Machu TK, McKernan RM, Whiting P, VanRenterghem BB, McManaman JL, Brozowski SJ, Smith GB, Olsen RW and Harris RA (1995) Tyrosine kinase phosphorylation of GABA_A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **31**, 165-172.

Valenzuela CF, Kazlauskas A, Brozowski SJ, Weiner JL, Demali KA, McDonald BJ, Moss SJ, Dunwiddie TV and Harris RA (1995) Platelet-derived growth factor receptor is a novel modulator of type A gamma-aminobutyric acid-gated ion channels. *Mol Pharmacol* **48**, 1099-1107.

Varecka L, Wu CH, Rotter A and Frostholm A (1994) GABA_A/benzodiazepine receptor alpha 6 subunit mRNA in granule cells of the cerebellar cortex and cochlear nuclei:

- expression in developing and mutant mice. *J Comp Neurol* **339**, 341-352.
- Venault P, Prado de Carvalho L, Brown CL, Dodd RH, Rossier J and Chapouthier G (1986) The benzodiazepine receptor ligand, methyl beta-carboline-3-carboxylate, is both sedative and proconvulsant in chicks. *Life Sci* **39**, 1093-1100.
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH and Sakmann B (1990) Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition. *Neuron* **4**, 919-928.
- Vergura R, Camarda V, Rizzi A, Spagnol M, Guerrini R, Calo G, Salvadori S and Regoli D (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**, 347-352.
- Vetiska SM, Ahmadian G, Ju W, Liu L, Wymann MP and Wang YT (2007) GABA_A receptor-associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced recruitment of postsynaptic GABA_A receptors. *Neuropharmacology* **52**, 146-155.
- 
- Wafford KA, Whiting PJ and Kemp JA (1993) Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **43**, 240-244.
- Wagner DA and Czajkowski C (2001) Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* **21**, 67-74.
- Waldvogel HJ, Baer K, Eady E, Allen KL, Gilbert RT, Mohler H, Rees MI, Nicholson LF and Faull RL Differential localization of gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor subunits and gephyrin in the human pons, medulla oblongata and uppermost cervical segment of the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* **518**, 305-328.
- Wallner M, Hanchar HJ and Olsen RW (2003) Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15218-15223.
- Wallner M, Hanchar HJ and Olsen RW (2006) Low dose acute alcohol effects on GABA A receptor subtypes. *Pharmacol Ther* **112**, 513-528.
- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF and Wang YT (1997) Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* **388**, 686-690.

- Wang RA, Cheng G, Kolaj M and Randic M (1995) Alpha-subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II enhances gamma-aminobutyric acid and inhibitory synaptic responses of rat neurons in vitro. *J Neurophysiol* **73**, 2099-2106.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ and Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**, 69-72.
- Wang H and Olsen RW (2000) Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* **75**, 644-655.
- Wang X, Zhong P and Yan Z (2002) Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* **22**, 9185-9193.
- Wang Q, Liu L, Pei L, Ju W, Ahmadian G, Lu J, Wang Y, Liu F and Wang YT (2003) Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron* **38**, 915-928.
- Watanabe T, Pakala R, Katagiri T and Benedict CR (2001) Synergistic effect of urotensin II with mildly oxidized LDL on DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circulation* **104**, 16-18.
- Watson AM and May CN (2004) Urotensin II, a novel peptide in central and peripheral cardiovascular control. *Peptides* **25**, 1759-1766.
- Watson AM, McKinley MJ and May CN (2008) Effect of central urotensin II on heart rate, blood pressure and brain Fos immunoreactivity in conscious rats. *Neuroscience* **155**, 241-249.
- Webster HH and Jones BE (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* **458**, 285-302.
- Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M and Reeben M (1998) Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci* **10**, 350-357.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR and Mody I (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* **23**, 10650-10661.
- Wei W, Faria LC and Mody I (2004) Low ethanol concentrations selectively augment the tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABA(A) receptors in hippocampal neurons. *J Neurosci* **24**, 8379-8382.
- Wellings DA and Atherton E (1997) Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol* **289**, 44-67.
- Wenyi Z, Suzuki S, Hirai M, Hinokio Y, Tanizawa Y, Matsutani A, Satoh J and Oka Y (2003) Role of urotensin II gene in genetic susceptibility to Type 2 diabetes mellitus in Japanese

- subjects. *Diabetologia* **46**, 972-976.
- Westh-Hansen SE, Rasmussen PB, Hastrup S, Nabekura J, Noguchi K, Akaike N, Witt MR and Nielsen M (1997) Decreased agonist sensitivity of human GABA(A) receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the alpha1 subunit. *Eur J Pharmacol* **329**, 253-257.
- Westh-Hansen SE, Witt MR, Dekermendjian K, Liljefors T, Rasmussen PB and Nielsen M (1999) Arginine residue 120 of the human GABAA receptor alpha 1, subunit is essential for GABA binding and chloride ion current gating. *Neuroreport* **10**, 2417-2421.
- Whiteheart SW and Matveeva EA (2004) Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Struct Biol* **146**, 32-43.
- Whiting P, McKernan RM and Iversen LL (1990) Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma 2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9966-9970.
- Whiting PJ, McAllister G, Vassilatis D, Bonnert TP, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, O'Donnell R, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Marshall G, Thompson SA, Wafford KA and Vasilatis D (1997) Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABAA receptor subunit conferring atypical functional properties [corrected; erratum to be published]. *J Neurosci* **17**, 5027-5037.
- Whiting PJ (2003) GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* **8**, 445-450.
- Wieland S, Lan NC, Mirasdeghi S and Gee KW (1991) Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-o1-20-one. *Brain Res* **565**, 263-268.
- Wieland HA, Luddens H and Seeburg PH (1992) A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* **267**, 1426-1429.
- Wieland S, Belluzzi JD, Stein L and Lan NC (1995) Comparative behavioral characterization of the neuroactive steroids 3 alpha-OH,5 alpha-pregnan-20-one and 3 alpha-OH,5 beta-pregnan-20-one in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* **118**, 65-71.
- Wilke K, Gaul R, Klauck SM and Poustka A (1997) A gene in human chromosome band Xq28 (GABRE) defines a putative new subunit class of the GABAA neurotransmitter receptor. *Genomics* **45**, 1-10.
- Wilkinson IB, Affolter JT, de Haas SL, Pellegrini MP, Boyd J, Winter MJ, Balment RJ and Webb DJ (2002) High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc Res* **53**, 341-347.
- Williams DB and Akabas MH (2001) Evidence for distinct conformations of the two alpha 1 subunits in diazepam-bound GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* **41**, 539-545.

- Wingrove PB, Safo P, Wheat L, Thompson SA, Wafford KA and Whiting PJ (2002) Mechanism of alpha-subunit selectivity of benzodiazepine pharmacology at gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Eur J Pharmacol* **437**, 31-39.
- Wisden W, McNaughton LA, Darlison MG, Hunt SP and Barnard EA (1989) Differential distribution of GABA_A receptor mRNAs in bovine cerebellum--localization of alpha 2 mRNA in Bergmann glia layer. *Neurosci Lett* **106**, 7-12.
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H and Seuberg PH (1992) The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* **12**, 1040-1062.
- Wohlfarth KM, Bianchi MT and Macdonald RL (2002) Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABA(A) receptors containing the delta subunit. *J Neurosci* **22**, 1541-1549.
- Wotring VE, Chang Y and Weiss DS (1999) Permeability and single channel conductance of human homomeric rho1 GABAC receptors. *J Physiol* **521 Pt 2**, 327-336.

ꝝ X Ꝟ

Xi MC, Morales FR and Chase MH (2001) Effects on sleep and wakefulness of the injection of hypocretin-1 (orexin-A) into the laterodorsal tegmental nucleus of the cat. *Brain Res* **901**, 259-264.

Xiao RP (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* **2001**, re15.

Xiu X, Hanek AP, Wang J, Lester HA and Dougherty DA (2005) A unified view of the role of electrostatic interactions in modulating the gating of Cys loop receptors. *J Biol Chem* **280**, 41655-41666.

Xu M and Akabas MH (1996) Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J Gen Physiol* **107**, 195-205.

Xue H (1998) Identification of major phylogenetic branches of inhibitory ligand-gated channel receptors. *J Mol Evol* **47**, 323-333.

ꝝ Y Ꝟ

Yamawaki S (1999) The use and development of anxiolytics in Japan. *Eur Neuropsychopharmacol* **9 Suppl 6**, S413-419.

- Yan Z and Surmeier DJ (1997) D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* **19**, 1115-1126.
- Yano K, Hicks JW, Vaudry H and Conlon JM (1995) Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, Rana catesbeiana. *Gen Comp Endocrinol* **97**, 103-110.
- Yuan X, Yao J, Norris D, Tran DD, Bram RJ, Chen G and Luscher B (2008) Calcium-modulating cyclophilin ligand regulates membrane trafficking of postsynaptic GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* **38**, 277-289.
- Yulis CR and Lederis K (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7079-7083.



- Zafrakas M, Chorovicer M, Klaman I, Kristiansen G, Wild PJ, Heindrichs U, Knuchel R and Dahl E (2006) Systematic characterisation of GABRP expression in sporadic breast cancer and normal breast tissue. *Int J Cancer* **118**, 1453-1459.
- Zaman SH, Shingai R, Harvey RJ, Darlison MG and Barnard EA (1992) Effects of subunit types of the recombinant GABAA receptor on the response to a neurosteroid. *Eur J Pharmacol* **225**, 321-330.
- Zarri I, Bucossi G, Cupello A, Rapallino MV and Robello M (1994) Modulation by nitric oxide of rat brain GABAA receptors. *Neurosci Lett* **180**, 239-242.
- Zeller A, Arras M, Jurd R and Rudolph U (2007) Identification of a molecular target mediating the general anesthetic actions of pentobarbital. *Mol Pharmacol* **71**, 852-859.
- Zeller A, Jurd R, Lambert S, Arras M, Drexler B, Grashoff C, Antkowiak B and Rudolph U (2008) Inhibitory ligand-gated ion channels as substrates for general anesthetic actions. *Handb Exp Pharmacol*, 31-51.
- Zezula J and Sieghart W (1991) Isolation of type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors by immunoaffinity chromatography. *FEBS Lett* **284**, 15-18.
- Zhang Y, Li J, Cao J, Chen J, Yang J, Zhang Z, Du J and Tang C (2002) Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium. *Heart Vessels* **16**, 64-68.
- Zhang AY, Chen YF, Zhang DX, Yi FX, Qi J, Andrade-Gordon P, de Garavilla L, Li PL and Zou AP (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F792-798.

- Zheleznova N, Sedelnikova A and Weiss DS (2008) alpha1beta2delta, a silent GABAA receptor: recruitment by tracazolate and neurosteroids. *Br J Pharmacol* **153**, 1062-1071.
- Zhu WJ, Wang JF, Krueger KE and Vicini S (1996) Delta subunit inhibits neurosteroid modulation of GABAA receptors. *J Neurosci* **16**, 6648-6656.
- Zhu WJ and Vicini S (1997) Neurosteroid prolongs GABAA channel deactivation by altering kinetics of desensitized states. *J Neurosci* **17**, 4022-4031.
- Zhu WJ, Wang JF, Corsi L and Vicini S (1998) Lanthanum-mediated modification of GABAA receptor deactivation, desensitization and inhibitory synaptic currents in rat cerebellar neurons. *J Physiol* **511 (Pt 3)**, 647-661.
- Zhu HL, Wang DS and Li JS (2002) Cu²⁺ suppresses GABA(A) receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neurosignals* **11**, 322-328.
- Zhu YZ, Wang ZJ, Zhu YC, Zhang L, Oakley RM, Chung CW, Lim KW, Lee HS, Ozoux ML, Linz W, Bohm M and Kostenis E (2004) Urotensin II causes fatal circulatory collapse in anesthetized monkeys *in vivo*: a "vasoconstrictor" with a unique hemodynamic profile. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H830-836.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW and Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* **22**, 155-168.
- Zimmerman SA, Jones MV and Harrison NL (1994) Potentiation of gamma-aminobutyric acidA receptor Cl⁻ current correlates with *in vivo* anesthetic potency. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 987-991.
- Zou Y, Nagai R and Yamazaki T (2001) Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Lett* **508**, 57-60.
- Zwain IH and Yen SS (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* **140**, 3843-3852.