

Nos récepteurs déroulent leur mécanique !

Maxime Louet, Landry Charlier, Jean Martinez et Nicolas Floquet

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment une large famille de protéines à sept traversées transmembranaires (environ 800 chez l'Homme) permettant à nos cellules de communiquer avec leur environnement. Les données biochimiques et biophysiques disponibles montrent qu'après fixation de leur(s) ligand(s), les RCPG subissent des changements de conformation importants. Ainsi, une information chimique codée par la structure d'une petite molécule extracellulaire va pouvoir être interprétée mécaniquement de l'autre côté de la membrane, pour être finalement transmise aux partenaires intracellulaires favoris des RCPG : les protéines G hétérotrimériques. Depuis 2007, nous nous intéressons à la modélisation à l'échelle moléculaire de ces récepteurs, seuls ou complexés à leurs partenaires favoris (ligands, protéines G).

Mots-clés

RCPG, récepteurs, protéine G, modélisation moléculaire, dynamique moléculaire, calculs de modes normaux.

Abstract

Our receptors reveal their mechanics!

G-proteins coupled receptors (GPCRs) form a large family of proteins (around 800 members) characterized by seven transmembrane segments. They permit to our cells to communicate with their surrounding environment. Together, available biochemical and biophysical data show that after binding of their ligands, GPCRs encounter large amplitude changes of conformation. Thus, a chemical information coded by the structure of a small molecule will be interpreted mechanically on the other side of the membrane, to be finally transmitted to their favored intra-cellular protein partners: hetero-trimeric G-proteins. Since 2007, we have been interested in the modeling at the molecular scale of these receptors, alone or complexed to their ligands and/or G-proteins partners.

Keywords

GPCR, receptors, G-protein, molecular modelling, molecular dynamics, normal mode analysis.



Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont pour la plupart caractérisés par une activité dite « basale », c'est-à-dire une activité en l'absence de tout ligand, et liée à leur rôle physiologique. De manière générale,

l'activation mécanique de ces récepteurs se produit par la liaison d'un ligand extracellulaire (petite molécule, peptide, protéine...) dans une poche désormais bien identifiée par la cristallographie [1]. Les données biochimiques et biophysiques disponibles dans la littérature montrent qu'après fixation de leur(s) ligand(s), les RCPG subissent des changements de conformation importants. Ainsi, une information chimique codée par la structure d'une petite molécule extracellulaire va pouvoir être interprétée mécaniquement de l'autre côté de la membrane, pour être finalement transmise aux partenaires intracellulaires favoris des RCPG : les protéines G hétérotrimériques. Comme leur nom l'indique, ces grosses protéines sont constituées de trois chaînes polypeptidiques, α , β et γ , et sont ancrées à la membrane par l'intermédiaire de résidus modifiés par des chaînes hydrophobes. Un modèle de l'interaction récepteur:protéine G est donné sur la *figure 1*.

Sous l'effet du couple ligand:récepteur, l'activation des protéines G s'opère alors en plusieurs étapes (voir *figure 2*) : (1) un échange entre une molécule de GDP (guanosine diphosphate) et une molécule de GTP (guanosine triphosphate) au sein de la sous-unité α de la protéine G (étape 2), conduisant à (2) une dissociation de la protéine G en deux blocs, α +GTP et $\beta\gamma$, ancrés à la membrane (étape 3) et

capables à leur tour d'activer d'autres protéines intracellulaires (étape 4). Grâce à une activité GTPasique intrinsèque, la sous-unité α va être finalement capable d'hydrolyser le GTP en GDP (étape 5), et ainsi de restaurer la formation de l'hétérotrimère inactif $\alpha\beta\gamma$ +GDP (étape 1), permettant l'initiation d'un nouveau cycle d'activation.

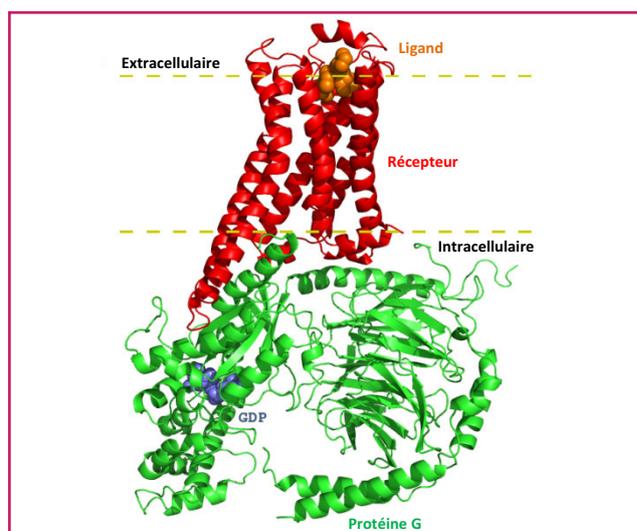


Figure 1 - Modèle du complexe RCPG (en rouge):protéine G (en vert) construit à partir de la structure cristallographique décrite par Kobilka [6].

La position supposée de la membrane est indiquée par les pointillés jaunes. Le ligand extracellulaire est représenté en orange, le GDP en bleu.

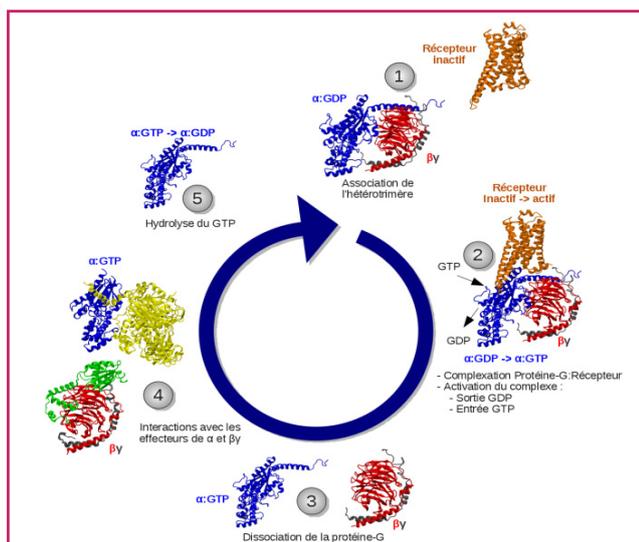


Figure 2 - Cycle d'activation du couple RCPG:protéine G. Les différentes sous-unités de la protéine G sont reportées en bleu, rouge et gris (α , β , γ respectivement).

Les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu dépendent directement du couple RCPG/protéine G impliqué, mais aussi de la nature même du ligand fixé dans la poche du récepteur. Ainsi, deux molécules différentes se liant au même récepteur vont être capables de stimuler différentes protéines G, en stabilisant vraisemblablement des conformations différentes du récepteur [2]. Cette observation est à l'origine du nouveau concept de ligand « biaisé » [3], un ligand conçu pour activer de manière sélective une seule voie de signalisation, réduisant ainsi les risques d'effets physiologiques non souhaités. Du fait de leur implication dans de nombreux processus physiologiques comme les perceptions visuelles, du goût et de la douleur, mais aussi la transmission nerveuse, la pression artérielle, la prise alimentaire, etc., ces récepteurs sont la cible d'environ 40 % des médicaments actuellement mis sur le marché. Pourtant, le rôle physiologique de nombre de ces récepteurs reste encore à élucider. Aussi, le développement de nouvelles molécules capables de stimuler ou d'inhiber l'activité des RCPG et/ou de leurs partenaires est une thématique forte de recherche tant sur le plan académique qu'industriel. Cette thématique a été fortement relancée ces dernières années par la publication de nombreuses structures cristallographiques décrivant ces récepteurs seuls ou complexés à différents ligands [4]. En effet, jusqu'en 2007, seule la rhodopsine disposait d'une structure cristallographique à haute résolution, alors qu'aujourd'hui, on connaît les structures de dix-neuf de ces récepteurs [5], complexés à différents ligands (agoniste, agoniste inverse, ou antagoniste⁽¹⁾). Une structure a été résolue montrant également les bases à l'échelle moléculaire de l'interaction entre un RCPG et une protéine G [6]. Ces avancées ont été possibles grâce à la mise au point de nouvelles techniques de cristallisation des protéines membranaires, notamment dans le groupe de Brian Kobilka (Université de Stanford), récompensé par le prix Nobel de chimie 2012 [7]. Pourtant, et malgré ces avancées, la mécanique d'activation de ces récepteurs et de leurs partenaires à l'échelle moléculaire reste encore incomprise. La cause : probablement les conditions de cristallisation qui capturent préférentiellement une forme « inactive » de ces récepteurs et ce, quelle que soit la nature du ligand co-cristallisé. Aussi, dans cette optique de compréhension de la mécanique d'activation de ces récepteurs, l'outil informatique et en particulier la

modélisation moléculaire ont un rôle clé à jouer. Depuis 2007, nous nous intéressons à la modélisation à l'échelle moléculaire de ces récepteurs seuls ou complexés à leurs partenaires favoris (ligands, protéines G).

Une mécanique complexe et multi-échelles de temps

L'activation des complexes RCPG:protéine G implique différentes étapes suspectées d'apparaître à des échelles de temps très diverses, de la nano (10^{-9} s) à la milliseconde (10^{-3} s). Aussi, l'étude de ces différentes étapes implique l'utilisation de méthodes de modélisation moléculaire différentes et adaptées. Si la dynamique moléculaire est une méthode de choix pour l'étude des réarrangements locaux des protéines (orientations de chaînes latérales, mouvements de boucles), les calculs de modes normaux sont, de leur côté, particulièrement utiles pour identifier de larges changements de conformation des protéines (mouvements de domaines). Ces deux méthodes très complémentaires et basées sur les mêmes champs de forces (celui de CHARMM [8] dans la plupart de nos études) ont chacune leurs avantages et leurs limitations ; la limitation principale de la dynamique moléculaire réside dans le temps effectif nécessaire à l'échantillonnage des mouvements de la protéine étudiée, surtout si cette protéine est membranaire [9]. En revanche, la dynamique moléculaire permet d'étudier la protéine en conditions dites « explicites » de simulation, c'est-à-dire en incluant le solvant et la membrane dans les calculs. Les calculs de modes normaux sont généralement réalisés dans le vide (phase gazeuse), mais présentent l'avantage d'être très peu coûteux en temps de calcul. De nombreuses études récentes ont montré que malgré cette énorme approximation, les calculs de modes normaux étaient particulièrement efficaces pour identifier les mouvements intrinsèques (collectifs) des protéines, mouvements généralement reliés à leurs fonctions [10]. Depuis quelques années, et en étroite collaboration avec David Perahia (ENS Cachan), nous avons appliqué les calculs de modes normaux à diverses protéines et montré notamment leur utilité pour préciser les interactions ligand:protéine [11] ou protéine:protéine [12].

D'abord, bien comprendre la dynamique des différents partenaires isolés

Le(s) récepteur(s)

Dans une étude récente, nous avons appliqué les calculs de modes normaux au récepteur de la ghréline, un RCPG largement étudié au laboratoire et impliqué dans la régulation de la prise alimentaire [13]. Puisque la structure de ce récepteur n'a pas encore été résolue, un modèle initial a été construit en utilisant les méthodes de modélisation par homologie de séquence. Par la suite, nous avons identifié un certain nombre de mouvements possibles pour ce récepteur et suspecté l'un d'entre eux d'être relié à son activité basale. Cette hypothèse nous a permis de proposer un rôle direct de l'histidine 280 dans la stabilisation de l'état actif du récepteur de la ghréline (voir figure 3). En collaboration avec les équipes de biologie et de chimie de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, Montpellier – Jean-Louis Banères, Jean-Alain Fehrentz), des expériences de mutagenèse dirigée, couplées à des tests pharmacologiques (Céline M'Kadmi,

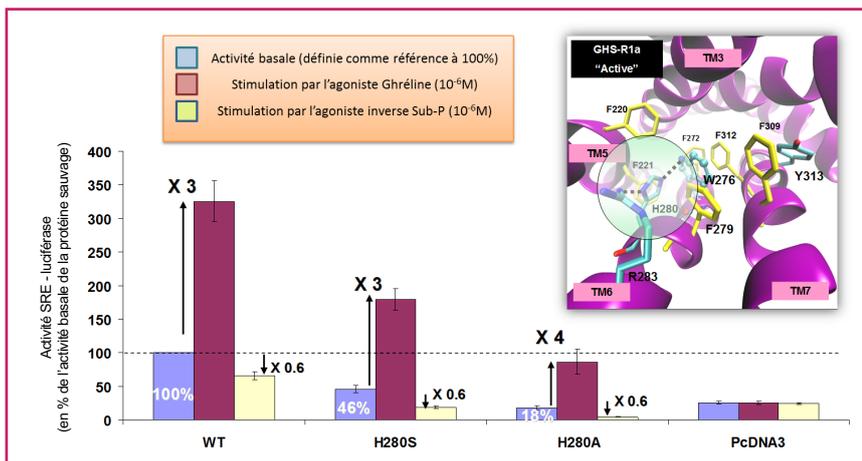


Figure 3 - Résultats de mutations introduites dans le récepteur de la ghreline à la position 280, après examen du modèle d'activation issu des calculs de modes normaux [14]. Le résultat principal est la baisse de l'activité constitutive de 80 % (H280A), tout en gardant une stimulation efficace par l'agoniste et l'agoniste inverse.

Didier Gagne, Jacky Marie, Jean-Claude Galleyrand) ont permis de vérifier cette hypothèse, et de constater une diminution d'environ 80 % de l'activité basale du récepteur de la ghreline dans les mutants H280S et H280A [14]. De manière intéressante, nous avons observé que la liaison du ligand agoniste naturel, la ghreline, n'était pas affectée par ces mutations, confirmant un découplage entre l'activité basale et celle induite par le ligand, et validant, *a posteriori*, le modèle du couple peptide:récepteur proposé par amarrage moléculaire⁽²⁾. Nous menons actuellement des études comparables sur les interactions impliquant les récepteurs de la neurotensine, un RCPG impliqué dans la douleur (collaboration avec Florine Cavelier, IBMM), mais aussi celui de la vasopressine, au rôle vasoconstricteur (collaboration avec Bernard Mouillac, Institut de Génétique Fonctionnelle). Des résultats préliminaires laissent suggérer une mécanique commune d'activation des RCPG, liée au repliement tridimensionnel de ces protéines, particulièrement très conservé, et ce malgré une grande variabilité de leurs séquences en acides aminés.

Les protéines G

Malgré leur rôle primordial, peu d'études de mécanique moléculaire ont été réalisées à ce jour sur les protéines G. Pourtant, ces protéines, dont les premières structures cristallographiques ont été publiées dans les années 1990 [15], sont bien les premières actrices intracellulaires des messages médiés par les RCPG. Nous avons été les premiers à réaliser des simulations de dynamique moléculaire de ces protéines, ancrées à la membrane, dans leur état conformationnel dit « inactif », c'est-à-dire dans leur état $\alpha\beta\gamma$ +GDP [16]. Si le choix d'orientation de ces protéines à la surface interne de la membrane peut apparaître délicat au premier abord (figure 4A), il en va de même de leurs mouvements intrinsèques, peu importants, observés lors de simulations de dynamique moléculaire (figure 4B). Des calculs de modes normaux similaires à ceux réalisés sur les RCPG nous ont permis de proposer des mouvements réalistes de ces protéines à proximité de la bicouche de phospholipides. Nous avons en particulier montré que la sortie du GDP hors de la sous-unité α (figure 4C) nécessitait un mouvement inter-domaine, en bon accord

avec les mouvements fonctionnels décrits/proposés dans la littérature (figure 4D).

Des calculs plus quantitatifs de dynamique moléculaire permettant de forcer la sortie du GDP lors de simulations à l'échelle de la centaine de nanosecondes nous ont permis de confirmer l'importance de ce mouvement [17]. Le coût énergétique associé à la sortie du nucléotide a pu également être précisé et une voie préférentielle de sortie identifiée, du côté de ses phosphates, contrairement à l'idée reçue de la littérature. Grâce aux détails obtenus à l'échelle moléculaire, des résidus de la protéine G ont pu être identifiés et proposés à la mutation, rendant possiblement plus facile ou difficile la sortie du ligand. Dans une autre étude plus récente, nous nous sommes également intéressés à la capacité des protéines G à se séparer en

deux blocs suite à l'échange GDP:GTP. En utilisant la dynamique moléculaire dirigée (ou « targeted molecular dynamic »), nous avons effectué des simulations où la sous-unité α de la protéine G a été forcée à transiter entre ses deux états liés au GDP et au GTP, tous deux connus en cristallographie. Nos calculs ont permis de préciser les réarrangements conformationnels opérant d'abord au niveau local, puis à l'interface entre les deux sous-unités α et β [18]. De manière assez surprenante, nous avons montré que les petits réarrangements structuraux connus pouvaient, de proche en proche, induire une séparation quasi complète des deux blocs lors de simulations de dynamique moléculaire réalisées à l'échelle de la centaine de nanosecondes (figure 5).

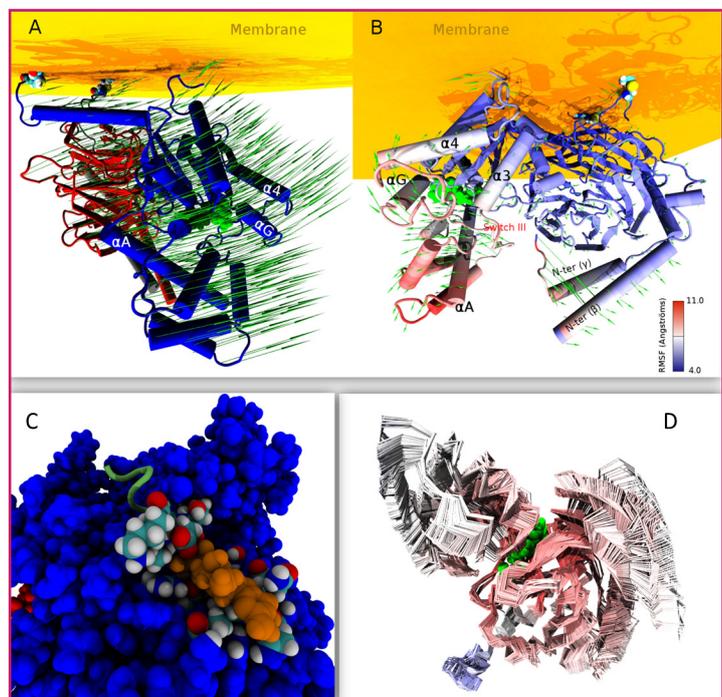


Figure 4 - Orientation (A) et mouvements intrinsèques (B) de la protéine G, ancrée à la membrane lors de simulations de dynamiques moléculaires (pour plus de détails, voir [16]). (C) Sortie forcée du GDP (en orange) hors de la sous-unité α de la protéine G (en bleu) et mouvements globaux de la protéine induits par cette sortie (D) (d'après [17]).

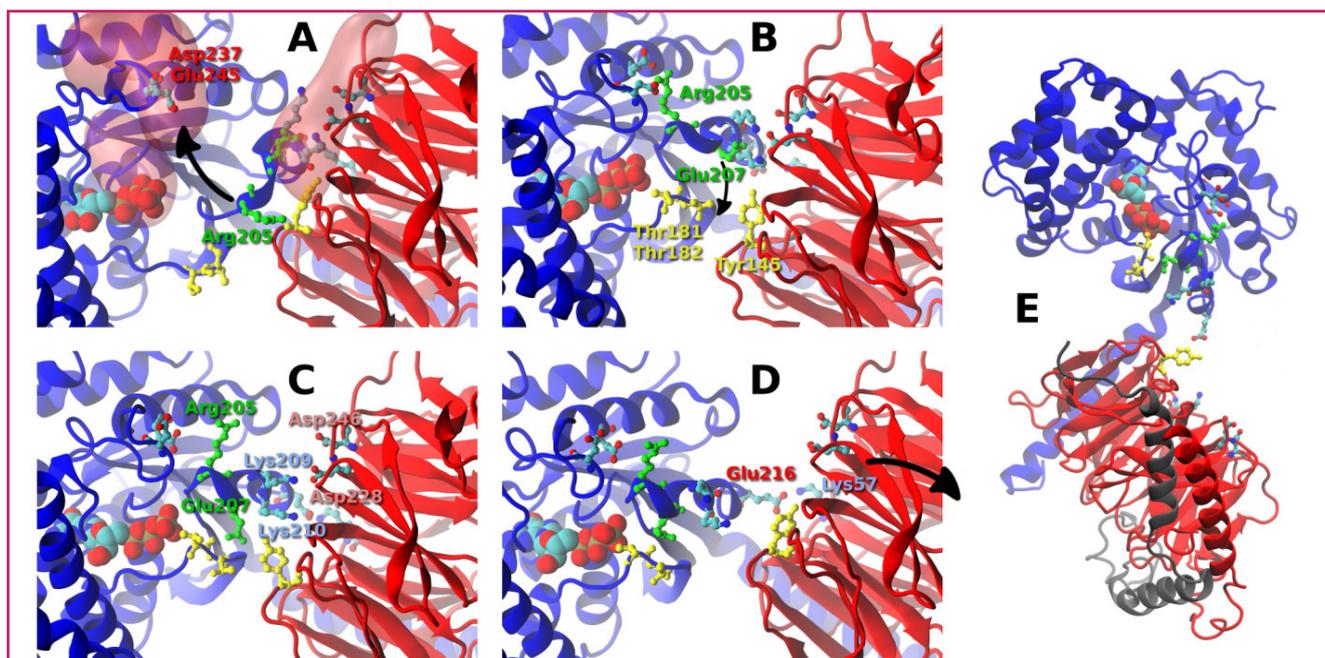


Figure 5 - Étapes de séparation de la protéine G_i en deux blocs ancrés à la membrane, comme observées en dynamique moléculaire dirigée. Cette séparation fait suite à la réorientation de chaînes latérales de résidus chargés (résidus en vert sur les étapes A et B), provoquant des réarrangements plus importants à l'interface $\alpha:\beta$ (étapes C et D). Une fois ces réarrangements effectués, les deux chaînes α et β se séparent sur des échelles de temps plus longues de l'ordre de la centaine de nanosecondes (E). Pour plus de détails, voir [18].

Le complexe ligand+récepteur+protéine G : la clé ?

De plus en plus de données récentes de la littérature suggèrent que les complexes RCPG:protéines G pourraient être pré-assemblés à la membrane, expliquant une réponse très rapide à leurs stimuli. Aussi, le mouvement de couplage de ces récepteurs, capturé par la cristallographie, ne reflète peut-être pas, comme on a pu le croire un moment, leur mouvement d'activation. Dans cette perspective, l'étude des mouvements existants dans le complexe RCPG:protéine G apparaît comme le point clé de la compréhension de l'activation de ces gros complexes protéine:protéine à proximité de la membrane. Là encore, la taille importante de ces systèmes moléculaires encourage l'utilisation de méthodes adaptées, en particulier des calculs de modes normaux et des modèles « gros grains » [19], là où la dynamique moléculaire classique trouve ses limites. Nous avons montré récemment que la dynamique des partenaires récepteur+protéine G liés n'était pas du tout la même que celle des partenaires isolés [20]. Ces résultats sont très encourageants car ils sembleraient indiquer que le couplage protéine:protéine aurait pour but ultime de sélectionner un ou plusieurs mouvements fonctionnels du récepteur. Des calculs en cours visent désormais à comprendre comment la nature même du ligand lié dans la poche du récepteur pourrait affecter cette dynamique conformationnelle.

Des perspectives passionnantes de multidisciplinarité

L'étude des complexes RCPG:protéine G n'a pas encore révélé tous ses mystères. Pour comprendre comment la nature du ligand lié peut affecter la dynamique conformationnelle de ces gros complexes protéine:protéine, le développement de nouvelles méthodes combinant dynamique moléculaire et calculs de modes normaux va jouer un rôle

primordial. Un autre aspect particulièrement intéressant réside dans la prédiction *in silico* du mode de liaison d'un ligand à son récepteur. Inspirés par les travaux effectués récemment sur le récepteur β -adrénergique [21], nous effectuons actuellement de tels calculs pour prédire, sans aucune contrainte appliquée, les interactions peptides:récepteurs à l'échelle moléculaire. Dans cette optique, l'utilisation de méthodes quantitatives comme la métadynamique jouera un rôle clé. La littérature biochimique, biophysique et structurale montre que les RCPG peuvent également former des complexes plus gros (dimères, oligomères), gouvernant leur mode d'activation et leurs interactions avec leurs partenaires [22]. Dans ce contexte, les études par mécanique moléculaire des RCPG ont encore de belles années devant elles, surtout lorsque les hypothèses issues des calculs peuvent être vérifiées expérimentalement, comme c'est le cas au sein de l'IBMM.

Notes et références

- (1) L'activité basale des RCPG peut être modulée de différentes façons : un agoniste va augmenter le signal lié au récepteur, soit partiellement (agoniste partiel), soit jusqu'au maximum de son activité (agoniste plein). Un agoniste inverse va lui être capable de réduire l'activité basale du récepteur. Un antagoniste est une molécule neutre, n'affectant pas l'activité basale du récepteur, mais agissant comme un compétiteur pour d'autres molécules.
- (2) L'amarrage moléculaire (en anglais, « docking ») est une méthode statistique visant à prédire les interactions entre deux molécules.
- [1] Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G.F., Kobilka B.K., The structure and function of G-protein-coupled receptors, *Nature*, **2009**, 459, p. 356.
- [2] Mary S. *et al.*, Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G-protein-coupled receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, p. 8304.
- [3] Denis C., Saulière A., Galandrin S., Sénard J.-M., Galés C., Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands, *Curr. Pharm. Des.*, **2012**, 18, p. 128.
- [4] Venkatakrishnan A.J. *et al.*, Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature*, **2013**, 494, p. 185.
- [5] <http://gpcr.scripps.edu>
- [6] Rasmussen S.G.F. *et al.*, Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*, **2011**, 477, p. 549.
- [7] Bockaert J., G-protein coupled receptors. Nobel Prize 2012 for chemistry to Robert J. Lefkowitz and Brian Kobilka, *Med. Sci.*, **2012**, 28, p. 1133.

- [8] Brooks B.R. *et al.*, CHARMM: the biomolecular simulation program, *J. Comput. Chem.*, **2009**, *30*, p. 1545.
- [9] Grossfield A., Feller S.E., Pitman M.C., Convergence of molecular dynamics simulations of membrane proteins, *Proteins*, **2007**, *67*, p. 31.
- [10] Bahar I., Lezon T.R., Bakan A., Shrivastava I.H., Normal mode analysis of biomolecular structures: functional mechanisms of membrane proteins, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, p. 1463.
- [11] Floquet N. *et al.*, Normal mode analysis as a prerequisite for drug design: application to matrix metalloproteinases inhibitors, *Febs Lett.*, **2006**, *580*, p. 5130.
- [12] Floquet N., Dedieu S., Martiny L., Dauchez M., Perahia D., Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domain opens to interact with the CD-47 receptor: a molecular modeling study, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, *478*, p. 103.
- [13] Schaeffer M. *et al.*, Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, p. 1512.
- [14] Floquet N. *et al.*, Activation of the ghrelin receptor is described by a privileged collective motion: a model for constitutive and agonist-induced activation of a sub-class A G-protein coupled receptor (GPCR), *J. Mol. Biol.*, **2010**, *395*, p. 769.
- [15] Wall M.A. *et al.*, The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2, *Cell*, **1995**, *83*, p. 1047.
- [16] Louet M., Perahia D., Martinez J., Floquet N., A concerted mechanism for opening the GDP binding pocket and release of the nucleotide in heterotrimeric G-proteins, *J. Mol. Biol.*, **2011**, *411*, p. 298.
- [17] Louet M., Martinez J., Floquet N., GDP release preferentially occurs on the phosphate side in heterotrimeric G-proteins, *PLoS Comput. Biol.*, **2012**, *8*, p. e1002595.
- [18] Louet M., Charlier L., Martinez J., Floquet N., Dissociation of membrane-anchored heterotrimeric G-protein induced by G(α) subunit binding to GTP, *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, *52*, p. 3022.
- [19] Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H., The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, p. 7812.
- [20] Louet M., Karakas E., Perret A., Perahia D., Martinez J., Floquet N., Conformational restriction of G-proteins: coupled receptors (GPCRs) upon complexation to G-proteins: A putative activation mode of GPCRs?, *FEBS Lett.*, **2013**, *587*, p. 2656.
- [21] Dror R.O. *et al.*, Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, p. 13118.
- [22] Johnston J.M., Wang H., Provasi D., Filizola M., Assessing the relative stability of dimer interfaces in G protein-coupled receptors, *PLoS Comput. Biol.*, **2012**, *8*, p. e1002649.



M. Louet



L. Charlier



J. Martinez



N. Floquet

Maxime Louet

est postdoctorant au Heidelberg Institute for Theoretical Studies (Allemagne). Il a effectué sa thèse en 2012 sous la codirection de Jean Martinez et Nicolas Floquet.

Landry Charlier

est postdoctorant dans l'équipe de modélisation de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, UMR 5247 CNRS)* où il étudie les aspects « gros grains » des RCPG.

Jean Martinez

est directeur de l'IBMM*.

Nicolas Floquet (auteur correspondant)

est chargé de recherche à l'IBMM*. Il a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2012.

* Institut des Biomolécules Max Mousseron (UMR 5247 CNRS), Faculté de Pharmacie, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, F-34093 Montpellier Cedex 05.
Courriel : Nicolas.floquet@univ-montp1.fr

Enfin!

Un spectromètre de masse destiné au chimiste
L'expression CMS
(Compact Mass Spec)

Advion

20 ans d'expérience en spectrométrie de masse

www.expressioncms.com
info@advion.com

Simple et multitâche

peu onéreux à l'usage

- ✓ Suivi de réactions
Identification directe des spots CCM en 30 secondes
- ✓ Identification de composés
Identification rapide du composé en moins de 30 secondes par FIA/CMS
- ✓ Purification de produits
Purification par masse à partir de l'analyse SFC, Flash ou LC/Prep
- ✓ Identification d'impuretés
Sensibilité LC/MS sur tout système UHPLC

Compact
Rapide
Simple
& Abordable!