

Université de Sherbrooke

Le photomarquage en fonction de la température du récepteur d'angiotensine II de type 1 mène à une meilleure compréhension du mécanisme d'activation

Par Jason Arsenault

Département de Pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade philosophiae doctor (Ph. D.) en Pharmacologie

Juin 2010

Cette thèse a été évaluée par Dr. Emanuel Escher, Dr. Pierre Lavigne, Dr. Guylain Boulay et Dr. Martin Bisailon à l'Université de Sherbrooke et par Dr. Hans H. Zingg de l'Université de McGill



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-89662-4*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-89662-4*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.  
-Louis Pasteur

Comprendre c'est avant tout unifier.  
-Albert Camus

The joy of life consists in the exercise of one's energies, continual growth, constant change, the enjoyment of every new experience. To stop means simply to die. The eternal mistake of mankind is to set up an attainable ideal.  
-Aleister Crowley

Weck das Feuer in mir  
-anonymer Philosoph

## Table des Matières

Publications.....	v
Liste des illustrations.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des sigles, abréviations et symboles.....	xi
Résumé.....	xiii
1. Introduction :	
1.1 RCPG.....	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 Génétique.....	2
1.1.3 Fonction.....	5
1.1.4 Structure et méthodes d'analyse structurale.....	11
1.1.5 Théorème d'activation.....	16
1.1.6 Perspectives.....	18
1.2 Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	19
1.2.1 Physiologie.....	19
1.2.2 Pathologie.....	23
1.2.3 Pharmacologie.....	24
1.3 Récepteurs d'angiotensine II.....	26
1.3.1 hAT <sub>1</sub> .....	26
1.3.2 hAT <sub>2</sub> .....	27
1.3.3 Protéine liant l'angiotensine II.....	29
1.4 hAT <sub>1</sub> .....	30

1.4.1	Séquence codante.....	30
1.4.2	Structure.....	31
1.4.3	Activation.....	36
1.4.4	Mutants constitutivement actifs et inactifs.....	39
1.4.5	Signalisation pléiotropique.....	43
1.5	Photomarquage.....	45
1.5.1	Bpa.....	45
1.5.2	MPA.....	50
1.5.3	Variation, Reproductibilité et Problématique.....	55
1.5.4	Thermodynamique et nouvelle méthodologie.....	58
1.5.5	Quantification des points de contact.....	65
2.	Article publié 1 : Temperature dependant photolabelling variation in hAT <sub>1</sub> .....	68
2.1	Avant propos.....	68
2.2	Résumé.....	69
2.3	Article 1.....	70
3.	Article accepté 2 : Temperature dependant photolabelling of methionine mutants enables a hierarchal ligand-receptor contact point accessibilities of the human Angiotensin II type 1 receptor and its Activation mechanisms.....	92
3.1	Avant propos.....	92
3.2	Résumé.....	93
3.3	Article 3.....	94
4.	Annexe 1.....	141
4.1	Matériels et Méthodes.....	142
4.2	Résultats.....	146
5.	Discussion .....	157

6. Conclusion et Perspectives.....	181
7. Remerciements.....	182
8. Listes des Références.....	184

## **Publications**

Reliées à cette thèse :

Arsenault, J., Renaud, M. P., Clement, M., Fillion, D., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. "Temperature-dependent variations of ligand-receptor contact points in hAT(1)." *Journal of Peptide Science* **13**(9): 575-80(2007).

Arsenault, J., Cabana, J., Fillion, D., Leduc, R., Guillemette, G., Escher, E. et Lavigne, P. "Temperature dependant photolabeling of the human Angiotensin II type 1 receptor reveals insights into its conformational landscape and its Activation mechanism." Accepté le 7 juin 2010 dans *Journal Biochemical Pharmacology*, in press, Ms. No. BCP-D-10-00412R1

Autres travaux :

Arsenault, J., Renaud, M. P., Clement, M., Fillion, D., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. "Temperature-induced ligand contact point variations of the hAT<sub>1</sub> receptor and of the constitutively active mutant N111G-hAT<sub>1</sub>." *Adv Exp Med Biol* **611**: 339-40(2009).

Arsenault, J., Lehoux, J., Lantier, L., Cabana, J., Guillemette, G., Lavigne, P., Leduc, R. et Escher, E. "A single nucleotide polymorphism of alanine to

threonine at position 163 of the human angiotensin II type 1 receptor impairs Losartan affinity." *Pharmacogenetics and genomics* 20 (6): 377-388. 2010.

Karamyan, V.T., Arsenault, J., Escher, E., Speth, R., "Preliminary biochemical characterization of the novel, non-AT1, non-AT2 angiotensin binding site from the rat brain." *Endocrine*: accepté le 25 mars 2010, in press.

## Liste des Illustrations

Figure 1.1 : Résidus hautement conservés dans la famille rhodopsine.....	4
Figure 1.2 : Activation de la protéine G.....	6
Figure 1.3 : Sélectivité fonctionnelle d'un ligand.....	10
Figure 1.4 : Modèle tridimensionnel du $\beta$ 2-adrénergique.....	12
Figure 1.5 : Alignement de séquence entre hAT <sub>1</sub> et les autres RCPG dont la structure fut résolue par diffraction au rayon X.....	14
Figure 1.6 : Théorèmes d'activations.....	17
Figure 1.7 : Le système rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	21
Figure 1.8 : Représentation schématique du type «Snake plot» du récepteur de l'Angiotensine II de type 1.....	28
Figure 1.9 : Diagramme d'énergie libre entre le WT et N111G hAT <sub>1</sub> .....	42
Figure 1.10 : Structure et mécanisme de photolyse du Bpa.....	47
Figure 1.11 : Mécanisme radicalaire entre le Bpa et une.....	49
Figure 1.12 : Digestion au CNBr de la protéine contenant des méthionines marquées au <sup>125</sup> I-[Sar <sup>1</sup> Bpa <sup>8</sup> ] AngII.....	52
Figure 1.13 : Représentation schématique de hAT <sub>1</sub> suivant une digestion au CNBr avec les résidus et la taille (en kDa) des fragments impliqués.....	54
Figure 1.14 : Matériel de photolyse des expériences de MPA.....	57
Figure 1.15 : Théorème énergétique des conformations.....	61
Figure 1.16 : Nouvelle appareil de photomarquage.....	64
Figure 2.1: Time-dependant photoreaction at 25°C.....	80
Figure 2.2: Incorporation yields as a function of temperature.....	81

Figure 2.3: hAT <sub>1</sub> and mutants photolabelled at different temperatures and digested with CNBr.....	83
Figure 2.4: Schematic representation of the possible fragment sizes obtained by CNBr digestion after photo-incorporation of the radioactive ligand into the receptor.....	85
Figure 3.S1 : Correlation coefficient between the densitometric analysis and the direct gel $\gamma$ counting of the most fluctuating mutant H256M.....	103
Figure 3.1 : Temperature dependant photolabeling of hAT <sub>1</sub> .....	107
Figure 3.S2 : Quantification of photolabeled regions of WT and N111G hAT <sub>1</sub> .....	109
Figure 3.S3 : Autoradiogram of the TM2, 3 and 5 mutants.....	113
Figure 3.2 : Histograms of TM2 and 3.....	115
Figure 3.3 : Histograms of TM5.....	119
Figure 3.S4 : Autoradiogram of TM6 mutants.....	120
Figure 3.4 : Histograms of TM6.....	122
Figure 3.5 : The range of action of Bpa.....	125
Figure 3.S5 : The complete ratios of all tested mutants.....	128
Figure 3.6 : Molecular modeling of WT and CAM hAT <sub>1</sub> .....	131
Figure 3.7 : Molecular modeling of [Bpa <sup>8</sup> ] AngII WT and CAM hAT <sub>1</sub> .....	132
Figure 4.1 : Photomarquage température dépendant des mutants H256M, N111G/H256M et N111W/H256M.....	148
Figure 4.2 : Photomarquage en fonction de la température où le pH a été contrôlé.....	150
Figure 4.3 : Photomarquage en fonction de la température suivie de différentes conditions de digestion au CNBr.....	151
Figure 4.4 : Production d'Inositols Phosphate en fonction de la température.....	152

Figure 4.5 : Distribution des longueurs d'onde des lampes UV.....	154
Figure 4.6 : Les ratios $\epsilon/\gamma$ de tous les mutants.....	156
Figure 5.1 : Activation de la rhodopsine.....	162
Figure 5.2 : Activation de la rhodopsine par dynamisme moléculaire.....	163
Figure 5.3 : Changement conformationnelle pouvant affecter le ratio de photomarquage.....	166
Figure 5.4 : Modélisation moléculaire du résidu N111W.....	178

## Liste des Tableaux

Tableau 3.1 : The methionine/TM7 ratios ( $f_{x/TM7}$ ) at 0°C and 37°C.....127

Tableau 4.1 : Affinités et expressions des doubles mutants N111W testés.....147

## Liste des abréviations

Abréviations	Nom complet
AC	Adénylate cyclase
AMPC	Adénosyne monophosphate cyclique
AngI	Angiotensine I
AngII	Angiotensine II
AngIII	Angiotensine III
AngIV	Angiotensine IV
ASA	Surface accessible au solvant
AT <sub>1</sub>	Récepteur d'angiotensine II de type 1
AT <sub>2</sub>	Récepteur d'angiotensine II de type 2
B <sub>max</sub>	Capacité maximale de liaison
Bpa	<i>p</i> -Benzoyl-L-Phénylalanine
CAM	Mutant constitutivement actif
COS	Proviens de cellules CV-1, porteuses de SV40
Cpm	Compte par minute
DAG	Diacyl glycérol
DTM	Domaine transmembranaire
ECA	Enzyme de conversion de l'Angiotensine
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
hAT <sub>1</sub>	Récepteur d'angiotensine II de type 1 humain
HEK	Cellules embryonnaires humaines du rein
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
kDa	Kilo Dalton
K <sub>d</sub>	Constante de dissociation
k <sub>on</sub>	Constante d'association « on-rate »
k <sub>off</sub>	Constante de dissociation « off-rate »
MPA	Essai de proximité aux méthionines
MTSEA	(2-aminoéthyl) méthanethiosulfate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	Tampon de solution phosphate
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PNGase-F	N-Glycosidase-F
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G (GPCR)
Sar	Sarcosine
SCAM	Méthode d'accessibilité aux cystéines substituées

SDS	Sodium dodécyl sulfate
Tdf	<i>p</i> -[3-(trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]-L-phénylalanine
UV	Ultra-violet
WT	Souche native (Wild Type).

## Résumé

### Le photomarquage en fonction de la température du récepteur d'angiotensine II de type 1 mène à une meilleure compréhension du mécanisme d'activation

Par

**Jason Arsenault**

Département de Pharmacologie  
Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph. D.)

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont réfractaires à l'application efficace des méthodes structurales pour étudier la structure 3D du complexe récepteur-ligands. Nous présentons une nouvelle méthode basée sur l'analyse de l'interaction ligand-RCPG à différentes températures avec le photomarquage par affinité exploitant des ligands contenant le photomarqueur p-Benzoyl-L-phénylalanine (Bpa). Cette approche nous a permis de générer un modèle du complexe du récepteur d'angiotensine II de type 1 (hAT<sub>1</sub>) avec le [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII à plus haute résolution et aussi d'identifier des différences conformationnelles entre la forme active et la forme inactive du récepteur.

Notre laboratoire a démontré que la position 8 du <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII formait un lien covalent avec le domaine transmembranaire 7 (DTM7) dans hAT<sub>1</sub>. Le Bpa, qui a une sélectivité réactionnelle pour les méthionines (Met), était ambiguë dans son rayon d'action variable. Néanmoins, cette sélectivité a permis d'élaborer l'essai de proximité aux Met (MPA). La température de photomarquage a été subséquemment identifiée comme un facteur important à contrôler dans les études de photomarquage. En étudiant ainsi les mutants Met positifs en MPA du récepteur hAT<sub>1</sub>, nous avons observé des changements importants lors de l'interaction ligand-récepteur en fonction de la température. À basse température, les fluctuations conformationnelles du complexe ligand-récepteur sont minimisées. Inversement, à 37°C, le complexe démontre une flexibilité structurale très importante. Les analyses de ces résidus photomarkés suivis d'une digestion au CNBr démontrent que l'accessibilité aux Met augmente proportionnellement avec la température. Ensuite, en photomarkant le mutant constitutivement actif, le N111G-hAT<sub>1</sub>, nous pouvons comparer les différences entre une forme basale et une forme plus active du récepteur. Les résultats sont quantifiés en un ratio du marquage Met/DTMVII et ceci nous donne un indice d'accessibilité entre le ligand et le résidu muté dans hAT<sub>1</sub>. Nous avons observé des différences thermodépendantes entre ces ratios d'accessibilités des mutants X→Met et N111G/X→Met. Ces ratios d'accessibilités ont été transformés en distance et insérés comme contraintes dans la modélisation moléculaire par refondu simulée. Nous voyons dans le récepteur un éloignement du haut du DTMVI, un rapprochement du DTMII et V et un petit déplacement du DTMIII lors de l'activation. Les différences dans les structures sont à la base des mécanismes d'activations d'hAT<sub>1</sub> et des RCPGs en général.

**Mots clefs:** Angiotensine II, Photomarquage, hAT<sub>1</sub>, thermodynamique, RCPG.

# **1. Introduction**

## **1.1 RCPG**

### **1.1.1 Introduction**

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aussi connus sous le nom de récepteurs métabotropiques, forment une des plus grandes classes de récepteur. Comme leur nom l'indique, ces protéines interagissent et activent les protéines G. Ces protéines se retrouvent à la membrane cytoplasmique et traduisent les signaux hormonaux extracellulaires vers les effecteurs intracellulaires. Ces récepteurs ont une panoplie de ligands différents variant de simples photons à des grosses protéines telles que des sérines protéases (Foord *et al.*, 2005). Ces récepteurs heptahéliques sont des joueurs principaux de la transduction des signaux extracellulaires vers l'intracellulaire (Ballesteros *et al.*, 2001). De plus, ces récepteurs sont ciblés par plus de 30 % des médicaments pharmaceutiques actuels (Flower, 1999; Russ et Lampel, 2005; Schlyer et Horuk, 2006). En 2003, 7 des 20 médicaments les plus vendus ciblaient directement un ou plusieurs RCPGs (Schlyer et Horuk, 2006). Il a été postulé que ces récepteurs sont impliqués dans la quasi-totalité des pathologies. L'industrie pharmaceutique porte donc un réel intérêt envers les RCPGs. Néanmoins, il existe très peu de structures tridimensionnelles de ces récepteurs hautement importants. L'approche rationnelle d'élaboration de médicaments a donc besoin de nouvelles méthodes et de connaissances approfondies pour obtenir des informations conformationnelles sur les RCPGs.

### 1.1.2 Génétique

Les récepteurs couplés aux protéines G composent approximativement 5 % du génome. Cela dit, plus de 800 gènes qui codent pour plus de 1000 récepteurs distincts (Foord *et al.*, 2005). Ces récepteurs peuvent se diviser en 5 familles phylogéniques : la famille de la rhodopsine (ou « rhodopsin-like»), la famille des sécrétines, la famille des récepteurs aux glutamates, la famille d'adhésion et la famille de Frizzled/TAS2 (Fredriksson *et al.*, 2003).

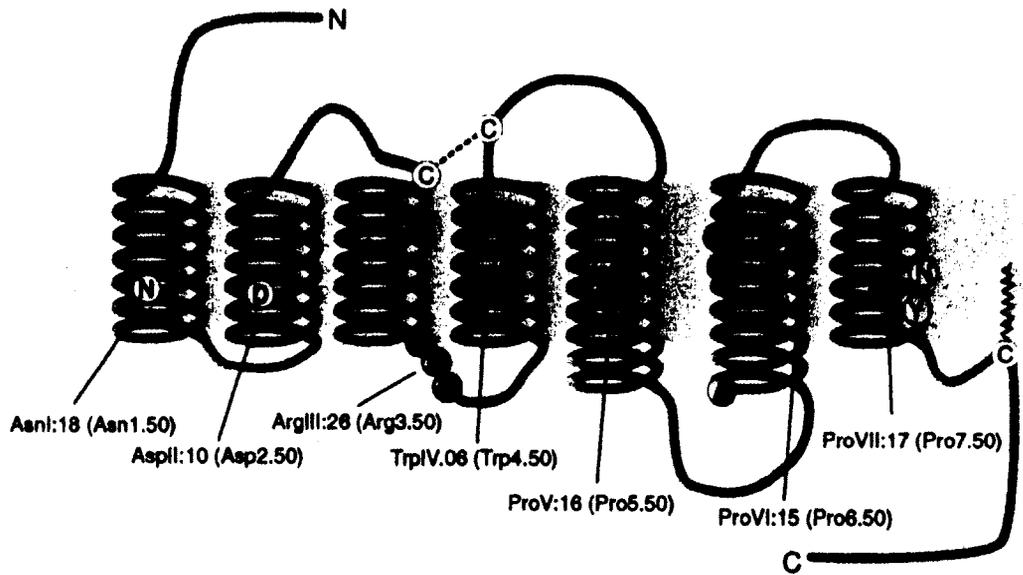
La première famille, qui est de loin la plus étudiée, correspond à la grande classe de la famille rhodopsine. Elle comprend plus de 700 différents récepteurs et plus que 2/3 de ces protéines sont des récepteurs olfactifs (Fredriksson *et al.*, 2003). Les ligands de cette famille sont des plus variés tels que des bioamines, des peptides, des lipides et des protéines (Foord *et al.*, 2005). Le récepteur hAT<sub>1</sub> fait partie de cette famille (de Gasparo *et al.*, 2000). Tout au long de cet ouvrage, nous allons utiliser la nomenclature de Ballesteros et Weinstein pour les récepteurs de la famille rhodopsine (Y.XX) (Ballesteros *et al.*, 2001; Ballesteros et Weinstein, 1995). Le premier chiffre avant le point (Y) dénote le domaine transmembranaire (1 à 7) et les deux chiffres après le point (XX) dénotent la position de l'acide aminé dans l'ordre N-terminal vers C-terminal. Le chiffre Y.50 dénote le résidu, dans le domaine transmembranaire Y qui est le plus hautement conservé. Ces résidus hautement conservés sont nécessaires pour aligner les structures primaires de tous les récepteurs de la famille rhodopsine. Ces résidus sont : à la position 1.50, une asparagine (N), à la position 2.50, un acide aspartique (D), à la position 3.50, une arginine (R), à la position 4.50, un tryptophane

(W) et une proline (P) aux positions 5.50, 6.50 et 7.50 (voir figure 1.1). Un pont disulfure hautement conservé est présent entre la première et la deuxième boucle extracellulaire (Ballesteros *et al.*, 2001; Gether et Kobilka, 1998). Une autre particularité très importante de cette classe est le DRY (ou ERY) dans le bas du domaine transmembranaire III (DTMIII) et le NPxxY dans le bas du DTMVII. Ces régions sont importantes pour l'activation et l'expression des récepteurs à la membrane (Alewijns *et al.*, 2000; Fritze *et al.*, 2003; Rovati *et al.*, 2007).

La seconde famille, celle de la sécrétine, est nommée d'après le premier récepteur cloné de cette classe. Elle est caractérisée par une région N-terminal de 50 à 60 acides aminés comportant plusieurs ponts disulfures hautement conservés importants pour la liaison des ligands (Fredriksson *et al.*, 2003). Les ligands de cette famille sont généralement gros, incluant, par exemple, le peptide intestinal vasoactif (3,5 kDa), la calcitonine (3,4 kDa) et le glucagon (3,5 kDa) (Foord *et al.*, 2005).

La troisième famille, celle des récepteurs au glutamate, est bien connue pour son très grand domaine N-terminal. Celle-ci comporte deux régions qui s'associent en présence du ligand, aussi connu sur le nom de « Venus-fly trap motif » (Fredriksson *et al.*, 2003). Les ligands de cette famille sont généralement très petits tels le glutamate, le calcium et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Foord *et al.*, 2005).

La quatrième famille, celle d'adhésion, est connue depuis peu et plutôt particulière. Le domaine N-terminal peut avoir plusieurs milliers d'acides aminés. Ceux-ci ont des répétitions de motifs d'adhésion tels que des répétitions de ligand, des motifs semblables aux mucines et des motifs riches en cystéines (Fredriksson *et al.*, 2003). La fonction de ces protéines serait impliquée dans l'adhésion entre les cellules (Stacey *et al.*, 2000).

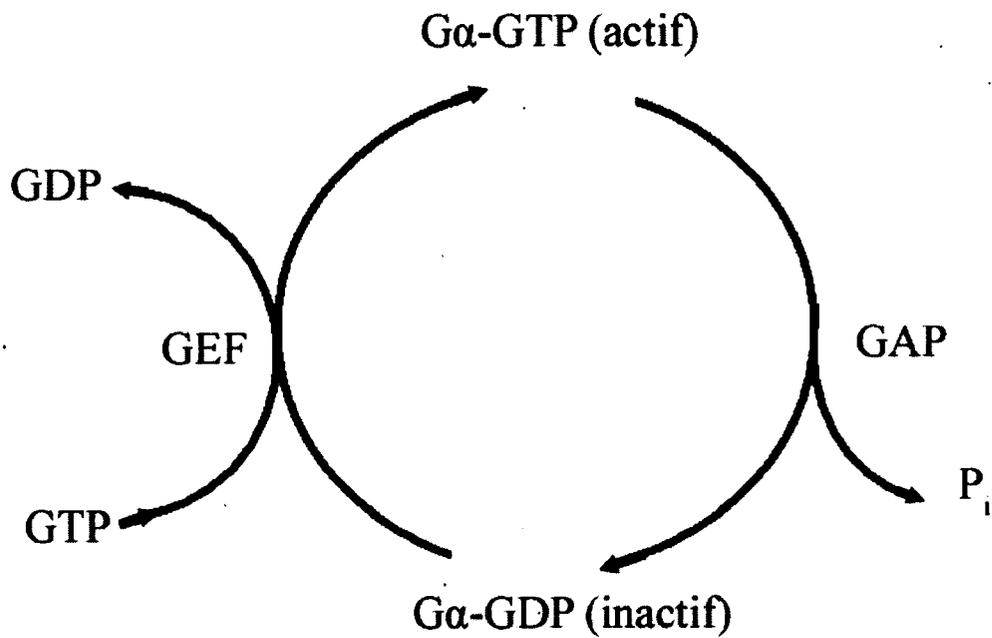


**Figure 1.1 :** Résidus hautement conservés dans la famille rhodopsine. Les chiffres (Y.XX), correspondant à la nomenclature Ballesteros et Weinstein, de chaque résidu XX le plus conservé (en position .50) sont indiqués et désignent aussi le domaine transmembranaire Y (1 à 7). Figure tirée de Gether, U. et Kobilka, B. (1998)

Enfin, la dernière famille, celle de Frizzled/TAS2, correspond aux récepteurs qui ont une homologie avec Frizzled et/ou TAS2. Les deux récepteurs, en tant que tels, ont peu d'homologie, mais ils ont quand même certaines régions hautement conservées telles que IFL dans le DTMII, SFLL dans le DTMV et SxKTL dans le DTMVII qui ne sont pas retrouvés dans les autres familles. Le sous-groupe TAS2 a aussi un très court N-terminal et pourrait ne pas avoir de ligand endogène (Fredriksson *et al.*, 2003). Plusieurs des récepteurs inclus dans les deux dernières familles sont toujours orphelins (aucune hormone endogène connue) (Foord *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Fonction

La fonction classique des RCPGs est l'activation des protéines G hétérotrimériques. L'activation du récepteur catalyse l'échange de nucléotides. Le guanosine diphosphate (GDP) ce fait libérer pour recevoir du guanosine triphosphate (GTP) (voir figure 1.2). Le RCPG sous sa forme active a donc une fonction d'échange de nucléotides à base de guanosine (GEF) (Oldham et Hamm, 2008). La protéine G est un complexe hétérotrimérique qui est composé des sous-unités  $G_{\alpha}$ ,  $G_{\beta}$  et  $G_{\gamma}$ . Il y a présentement 21 sous unités  $\alpha$ , 6 sous-unités  $\beta$  et 12 sous-unités  $\gamma$  connues (Oldham et Hamm, 2008). Suivant l'échange du GDP pour le GTP, la sous unité  $G_{\alpha}$  se dissocie de  $G_{\beta}$ ,  $G_{\gamma}$  et du RCPG pour produire son activité sur les protéines effectrices (Oldham et Hamm, 2008). Certaines protéines ont la capacité d'activer l'activité intrinsèque GTPasique de la protéine G (GAP).



**Figure 1.2 :** Activation de la protéine G. Une fois que la protéine  $G\alpha$ -GDP est activée par le GEF, le GDP se dissocie du complexe et permet l'association du GTP. En interagissant avec le GAP, la protéine  $G\alpha$ -GTP clive le GTP en GDP en libérant un Phosphate inorganique ( $P_i$ ).

Subséquentement, la protéine G clive le GTP, revient sous sa forme inactive et se recouple à  $G_{\beta}$  et  $G_{\gamma}$  (Oldham et Hamm, 2008).

Les sous-unités  $G_{\alpha}$  sont regroupées en fonction des leurs protéines effectrices. Ceux-ci sont principalement la voie du phospholipase C, phosphodiesterase, de l'adénylate cyclase (AC) et de Rho (Oldham et Hamm, 2008; Shichida et Morizumi, 2007; Simon *et al.*, 1991; Vilardaga *et al.*, 2009). De plus, les RCPGs peuvent être phosphorylés, internalisés, s'hétéro- et s'homodimériser et causer des transactivations (Linderman, 2008; Moore *et al.*, 2007). Un RCPG n'est pas non plus figé dans une voie, mais peut, en fonction du ligand, activer diverses voies sélectivement ou parallèlement (Christopoulos et Kenakin, 2002; Kenakin, 2007; Schulte et Levy, 2007). De plus, ces ligands peuvent être orthostériques, c'est-à-dire qu'ils se lient sur le site de l'hormone endogène, ou être allostériques, c'est-à-dire qu'ils se lient à un autre endroit sur le récepteur (Christopoulos et Kenakin, 2002; Kenakin, 2007).

Les récepteurs couplés à la protéine  $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$ ,  $G_{15/16}$  vont activer la voie de la phospholipase C (Mizuno et Itoh, 2009). Celle-ci, une fois activée, clivera le phosphatidyl inositol bisphosphate ( $PIP_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate ( $IP_3$ ). L'inositol triphosphate hydrophile se diffuse à la membrane plasmique du réticulum endoplasmique et active les canaux calciques récepteurs d' $IP_3$  (Mizuno et Itoh, 2009). Le réticulum endoplasmique qui est largement plus concentré en calcium que le cytoplasme libère son contenu calcique par diffusion passive une fois le canal ouvert (Putney, 2009). Diverses réponses cellulaires se produisent ensuite en fonction de la concentration calcique et du contexte cellulaire. Le diacylglycérol avec l'aide du calcium active la phosphokinase C qui phosphoryle les protéines cibles (Mizuno et Itoh, 2009).

Les récepteurs couplés aux protéines du type  $G_s$  ou  $G_{i/o}$  modulent la concentration intracellulaire d'adénosine triphosphate cyclique (AMPc).  $G_s$  et  $G_{oif}$  activent l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc tandis que  $G_i$ ,  $G_o$ ,  $G_t$  et  $G_z$  l'inactivent (Jiang et Bajpayee, 2009; Simon *et al.*, 1991). L'AMPc sera dégradé par la phosphodiesterase. La concentration d'AMPc contribuera à l'activation de la phosphokinase A (PKA) et de l'ouverture des canaux ioniques de calcium à la membrane cytoplasmique (Jiang et Bajpayee, 2009).

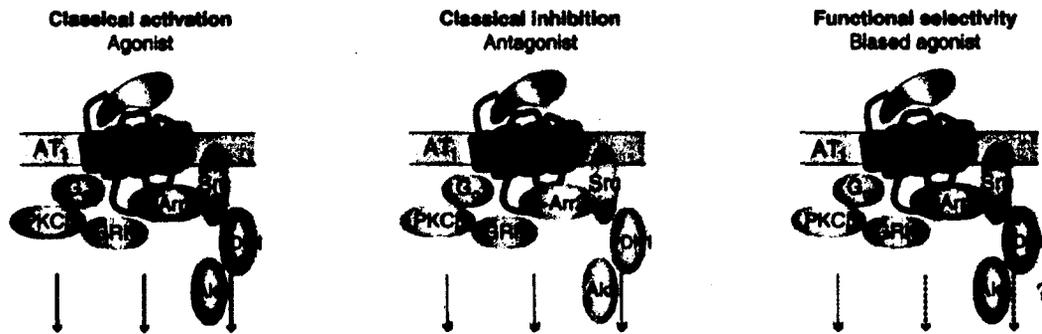
Les récepteurs couplés aux protéines du type  $G_{12/13}$  ont pour fonction d'activer Rho qui modulera le cytosquelette d'actine (Suzuki *et al.*, 2009). Cette réorganisation du cytosquelette est liée à la polarisation, la contraction et la migration des cellules (Suzuki *et al.*, 2009).

Certains mécanismes de régulation peuvent phosphoryler les RCPGs, principalement dans la région C-terminal et des boucles intracellulaires, pour moduler leur activité. Ces mécanismes peuvent aussi recruter des arrestines (arrestine 1-4) et internaliser les RCPGs (Moore *et al.*, 2007; Tobin *et al.*, 2008). Les RCPGs qui sont liés à l'arrestine seront internalisés par endocytose du type clathrine dépendante. Cependant, ces récepteurs internalisés peuvent encore activer certains effecteurs tels que p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) et  $PI_3K$  (phosphoinositide-3 kinase) (Moore *et al.*, 2007; Rajagopal *et al.*, 2005). Suivant leur internalisation, les récepteurs peuvent suivre un cheminement de dégradation ou de recyclage qui va les retourner à la membrane cytoplasmique. Ces régulations servent à moduler l'amplitude de la signalisation intracellulaire et font partie de la désensibilisation (Moore *et al.*, 2007).

Les RCPGs ont la propriété de s'homo- et de s'hétérodimériser (Ciruela, 2008; Fung *et al.*, 2009; Percherancier *et al.*, 2005). Les récepteurs de la famille glutamate tels que les récepteurs GABA forment des dimères spontanément (Galvez *et al.*, 2001). De nombreuses études ont aussi démontré l'oligomérisation des récepteurs dans la famille rhodopsine (Fung *et al.*, 2009). Il a été démontré que la dimérisation peut moduler l'affinité et l'efficacité de certains ligands ainsi que changer la protéine G impliquée dans la signalisation (Kenakin, 2002; Milligan, 2004; Neubig *et al.*, 2003; Pin *et al.*, 2007). Plusieurs autres molécules accessoires peuvent moduler l'activité des RCPGs, telles que les RAMP (receptor activity modifying protein), la composition lipidique, les modifications post traductionnelles, etc (Christopoulos et Kenakin, 2002; Kenakin, 2002; Kenakin, 2007).

La nature des ligands est importante pour le bon fonctionnement des RCPGs. Classiquement, un ligand était considéré comme étant soit agoniste soit antagoniste. Mais avec les connaissances actuelles, il se trouve qu'un ligand peut être antagoniste neutre, ou agoniste partiel, complet et même inverse (Kenakin, 2001; Kenakin, 2002). De plus, il est possible qu'un ligand puisse démontrer une sélectivité fonctionnelle pour une voie de signalisation par rapport aux autres (Aplin *et al.*, 2008; Kenakin, 2007; Pineyro, 2009; Urban *et al.*, 2007) (voir figure 1.3).

Tous ces partenaires d'interactions complexifient la compréhension structurale des RCPGs et ils apportent de nombreuses difficultés à l'application des méthodes biophysiques pour résoudre une structure statique. Les RCPGs sont donc très structurellement flexibles et cette flexibilité devrait être importante pour le bon fonctionnement physiologique.

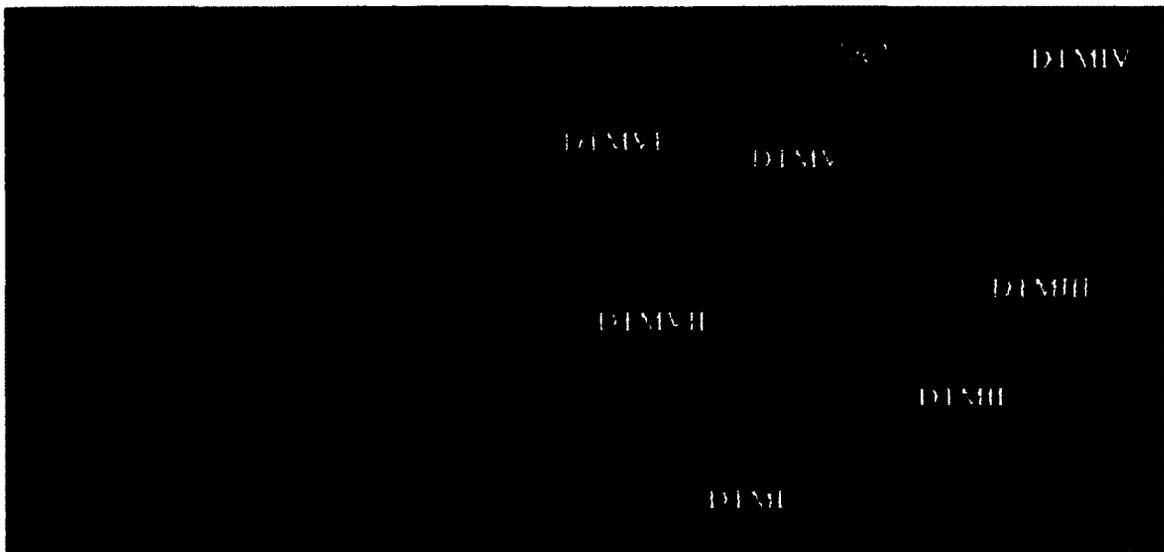


**Figure 1.3 :** Sélectivité fonctionnelle d'un ligand. L'activité d'un ligand peut être variable pour une voie en comparaison à une autre. Figure tirée d'Aplin, M. et al. (2008)

#### 1.1.4 Structure et méthodes d'analyse structurale

La structure secondaire d'un RCPG est formée de 7 domaines  $\alpha$ -hélicaux dont chacun traverse la membrane cytoplasmique. Le N-terminal est orienté vers l'extracellulaire et le C terminal est orienté vers l'intracellulaire. Il y a trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Par contre, pour corréler l'activité d'un ligand avec la structure du complexe ligand-récepteur, nous avons besoin d'une structure tridimensionnelle (Costanzi, 2008). La figure 1.4 montre la structure tridimensionnelle du  $\beta$ 2-adrénergique, un RCPG de la famille de rhodopsine.

La résolution de la première structure tridimensionnelle d'un RCPG fut celle de la rhodopsine bovine et elle a été réalisée en 2000 par le groupe de Palczewski (Palczewski *et al.*, 2000). La structure a pu être résolue par diffraction des rayons X. La rhodopsine bovine (*bos taurus*) étant retrouvée en grande quantité dans la rétine de bœuf et ce récepteur est aussi lié de façon covalente à un agoniste inverse (le *cis*-rétinal) qui maintient le récepteur dans une conformation inactive plutôt homogène (Oldham et Hamm, 2008). La conformation homogène est importante pour la formation de cristaux stable qui sera utilisée pour la diffraction des rayons X. De plus, un détergent non dénaturant est nécessaire pour isoler, reconstituer et maintenir la structure native de ces récepteurs (Cherezov *et al.*, 2007; Palczewski *et al.*, 2000). La rhodopsine demeure aussi la structure obtenue par diffraction à rayon X ayant la meilleure résolution et est la seule n'ayant subi aucune modifications génétiques (Ahuja et Smith, 2009).



**Figure 1.4 :** Modèle tridimensionnel du  $\beta_2$ -adrénergique. Cette structure fut obtenue durant l'étude de Cherezov, V. et al. (2007). Les bandes rouges indiquent l'interface approximative entre la membrane phospholipidique et le solvant. À droite une vue topographique (extracellulaire) du récepteur, on voit une distribution antihoraire des domaines transmembranaires.

Suivant cette étude, une structure avec une meilleure résolution fut obtenue pour la rhodopsine (2,2 Å versus l'original 2,8 Å) (Okada *et al.*, 2004) et aussi sous d'autres conformations d'activations intermédiaires qui lient la protéine G; telle que la forme métarhodopsine II et l'opsine (Park *et al.*, 2008; Salom *et al.*, 2006). En 2007, un deuxième RCPG a été résolu par diffraction des rayons X. Ce récepteur fut le  $\beta$ 2-adrénérique (Cherezov *et al.*, 2007; Day *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007). Par la suite, le récepteur  $\beta$ 1-adrénérique et l'opsine (rhodopsine en absence du *cis*-rétinal qui en est son agoniste inverse) ont aussi été résolus (Park *et al.*, 2008; Scheerer *et al.*, 2008; Warne *et al.*, 2008). Les séquences de ces récepteurs en comparaison avec hAT<sub>1</sub> sont représentées dans la figure 1.5.

La cristallisation et la diffraction des rayons X ne sont pas les seuls moyens d'avoir de l'information structurale sur les RCPGs. En effet, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est aussi parmi les méthodes biophysiques les plus couramment utilisées et permet aussi, contrairement à la diffraction des rayons X, d'étudier des macromolécules en solution. Par contre, à ce jour aucune structure complète à haute résolution d'un RCPG n'a été obtenue par RMN. Présentement, les spécialistes essaient d'augmenter le niveau d'expression de récepteurs pour isoler et purifier une meilleure quantité de cristaux (Ratnala, 2006).

D'autres méthodes telles que le SCAM (substituted cystein accessibility method) et le photomarquage par affinité peuvent aussi nous donner d'importantes informations structurales. Le SCAM consiste en une mutagenèse itérative des résidus du récepteur aux cystéines (Akabas *et al.*, 1992). Ces cystéines, à leur tour, vont réagir avec une petite molécule chargée qui affectera ou non la liaison du ligand.



Ces résultats donnent de l'information sur l'interaction ligand-récepteur (Holleran *et al.*, 2009; Javitch *et al.*, 1995). En combinaison avec une mutation constitutivement active, d'autres études ont démontré que des changements de conformations se produisent en analysant l'interaction ligand-récepteur en fonction d'une mutation constitutivement active du récepteur hAT<sub>1</sub> (Boucard *et al.*, 2003; Domazet *et al.*, 2009; Domazet *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009).

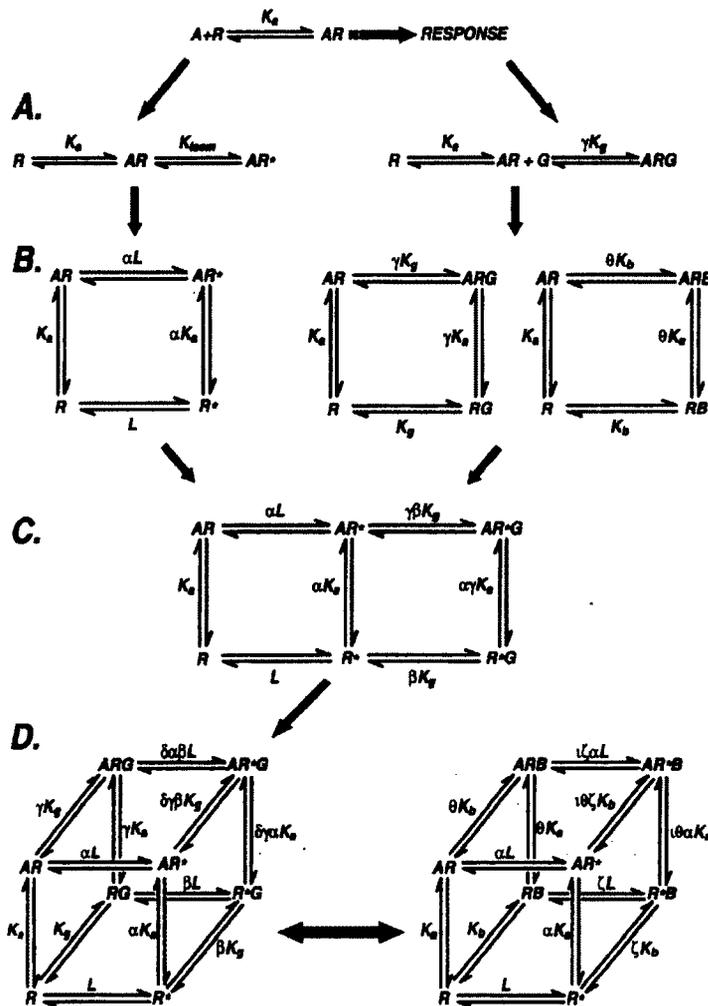
Le photomarquage par affinité est basé sur la modification d'un ligand pour insérer un traceur et une molécule photolabile telle une benzophénone, un azide ou une diazérine qui, une fois liée à l'intérieur du récepteur, peut se faire radicaliser et former respectivement un céto, nitrène et carbène réactifs (Bosse *et al.*, 1993; Fillion *et al.*, 2006; Gagnon *et al.*, 2006; Ruoho *et al.*, 1973). Ces radicaux vont former une liaison covalente entre le ligand et le récepteur. Le photomarquage par affinité peut servir à retrouver le récepteur *in situ* et *in vitro* (Bosse *et al.*, 1993; Hesse *et al.*, 1993). Suite à certaines digestions enzymatiques et chimiques, les régions de contact dans la pochette de liaison du récepteur peuvent être identifiés (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005; Perodin *et al.*, 2002; Rihakova *et al.*, 2002). (Voir section 1.5.1).

D'autres méthodes ont aidé à l'obtention d'informations structurales telles que le marquage de résidu par un « spin label » ou un chélateur d'ions qui permettent l'analyse des orientations des structures secondaires (Altenbach *et al.*, 1999; Elling *et al.*, 1999). La mutagenèse permet aussi l'identification de plusieurs résidus importants pour l'affinité et l'activation en faisant une substitution itérative avec des alanines par exemple (Guerrini *et al.*, 2009). La mutagenèse aux cystéines permet aussi de

confirmer certaines orientations des hélices en permettant la formation de liens entre les DTM (Yang *et al.*, 1996).

### 1.1.5 Théorème d'activation

Les RCPGs sont en équilibre avec toutes les protéines accessoires qu'ils peuvent lier. Vers la fin du 19<sup>e</sup> siècle, le théorème de « lock and key » avait été formulé par Emil Fisher suivant la loi d'action de masse (Bosshard, 2001). C'est-à-dire que lorsque qu'un récepteur inactif lie un agoniste ce complexe devient actif. La présence d'activités constitutives basales des récepteurs, l'existence de mutation constitutivement active, de modulateurs allostériques, de ligands ayant une signalisation sélective imposent une reformulation de ce modèle simpliste (Black et Leff, 1983; Christopoulos et Kenakin, 2002; Kenakin, 1997; Kenakin, 2004; Kenakin, 2007; Kobilka et Deupi, 2007; Xie et Freire, 1994). La figure 1.6 montre quelques théorèmes d'activation plus récents. La facilité d'interconversion de ces conformations serait déterminée par la constante d'équilibre entre les deux états. En théorie, il pourrait y avoir  $2^n$  conformations différentes où (n) est le nombre de molécules impliquées (Christopoulos et Kenakin, 2002). Ce nombre théorique de conformations augmente la flexibilité structurale et apporte beaucoup de difficulté à isoler le récepteur dans une conformation homogène utilisable pour les méthodes biophysiques actuelles. Idéalement pour que seulement les composantes voulues soient mesurées, le système ne devrait inclure que les molécules testées.



**Figure 1.6:** Théorèmes d'activation. A : L'agoniste (A) lié peut causer l'isomérisation des différents états. B : le modèle carré établi que le récepteur (R) peut s'isomériser pour former la forme active (R\*), se coupler à la protéine G (G) et à un ligand allostérique (B). C : le modèle tertiaire carré étendu combine le modèle à deux états précédents, mais permet seulement à la forme active de lier la protéine G. D : le modèle cubique tertiaire permet au récepteur inactif d'interagir avec la protéine G ou un modulateur allostérique. Figure tirée de Christopoulos, A. et Kenakin, T. 2002.

Il est possible d'isoler et de reconstituer fonctionnellement les RCPGs à l'intérieur de particules de lipoprotéines pour vérifier la contribution individuelle des molécules testées (Kuszak *et al.*, 2009). Il est important à noter que la présence de la protéine G couplée au récepteur va moduler l'affinité des ligands et ainsi la pochette de liaison pourrait être modifiée (Kenakin et Miller, 2010). La contribution de la protéine G peut être étudiée avec la présence d'un analogue du GTP non hydrolysable, le GTP $\gamma$ S, qui va empêcher la réassociation de la protéine G hétérotrimérique au complexe agoniste-RCPG (Harrison et Traynor, 2003). Les changements structuraux impliqués dans l'activation des récepteurs de la famille rhodopsine devraient être semblables puisqu'il y a une forte homologie de séquences entre ces RCPGs (Ballesteros *et al.*, 2001; Mirzadegan *et al.*, 2003; Patny *et al.*, 2006). Les mécanismes d'activations nécessaires à la transduction du signal du milieu extracellulaire vers les effecteurs intracellulaires requièrent des gains et des pertes d'interactions intramoléculaires du RCPG. La compréhension de ces interactions est primordiale pour les pharmacologues voulant construire des molécules ayant une activité visant à pousser l'équilibre d'interconversion d'une forme à l'autre.

### **1.1.6 Perspectives**

Les récepteurs couplés aux protéines G sont d'une importance primordiale pour les pharmacologues. En effet, ces protéines représentent une très grande fraction du génome humain et ils sont parmi les plus ciblées par les compagnies

pharmaceutiques. Afin de concevoir des médicaments par des approches rationnelles, nous devons connaître leurs structures et leurs mécanismes d'interconversion entre leurs conformations accessibles qui contribuent à leurs fonctions physiologiques. Ces protéines membranaires sont présentement un casse-tête thermodynamique très difficile à comprendre dans leur flexibilité conformationnelle (Cozzini *et al.*, 2008). Les structures rigides obtenues par diffraction aux rayons X ne démontrent pas l'étendue des mouvements permis à l'intérieur d'un RCPG (Kobilka et Schertler, 2008). Étant donné que le nombre de conformations possible est très difficile à estimer, il pourrait s'avérer dangereux de se restreindre à une interprétation structurale basée sur un modèle statique (Cozzini *et al.*, 2008; Kenakin, 2001). Il est donc important de concevoir de nouvelles méthodes pour l'analyse de ces récepteurs membranaires très réfractaires aux méthodes biophysique actuelles.

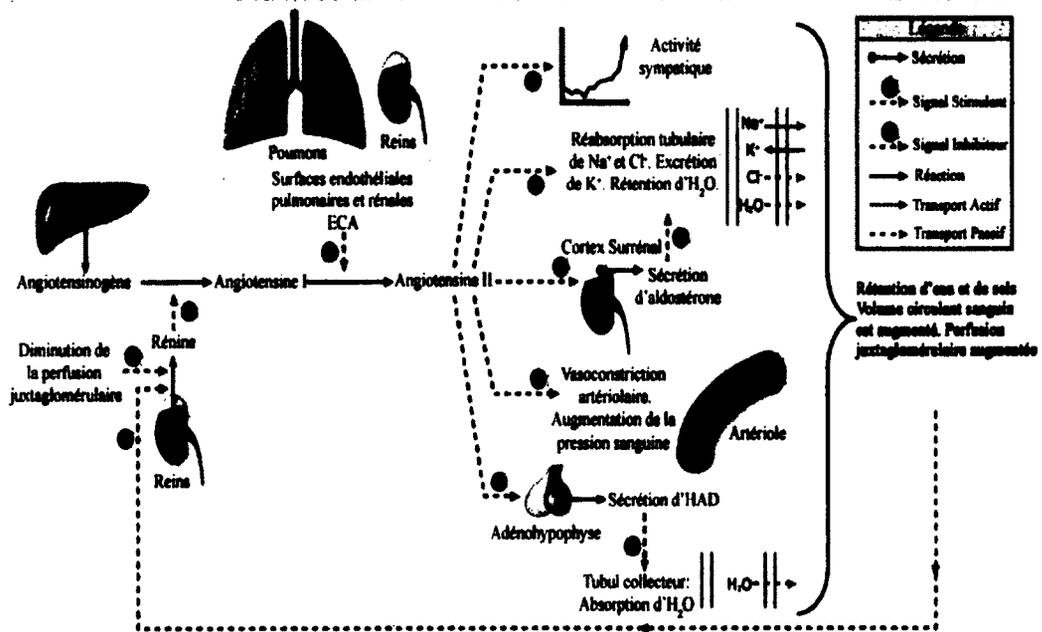
Une nouvelle méthode basée sur le photomarquage par affinité en corrélation avec le contrôle très précis de la température durant la photolyse sera présenté. Pour cela, le récepteur d'angiotensine II de type 1 sera présenté. Celui-ci est un RCPG prototypique de la famille rhodopsine. Il a été énormément étudié et est donc un candidat excellent pour valider la présente méthode.

## **1.2 Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone**

### **1.2.1 Physiologie**

Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS) a initialement été étudié en raison de son implication dans la régulation de la pression artérielle. La première composante découverte de ce système fut la rénine en 1897, nommée d'après son organe d'extraction (de Gasparo *et al.*, 2000). Presque un demi-siècle plus tard, deux groupes indépendants ont retrouvé une substance contractile qu'ils nommèrent hypertensine et angiotonine. Le consensus fut de nommer le composé « angiotensine » (de Gasparo *et al.*, 2000). Cet octapeptide est présentement connu sur le nom d'angiotensine II. L'angiotensine II régule à la fois le volume et le tonus vasculaire. Une suractivation de ce système peut mener à l'hypertension (de Gasparo *et al.*, 2000). La figure 1.7 démontre le système rénine-angiotensine-aldostérone physiologique classique.

La bioconversion de l'angiotensine II se fait à partir de son précurseur, l'angiotensinogène, qui est une glycoprotéine de 452 acides aminés produite par le foie (Kageyama *et al.*, 1984). L'angiotensinogène se fait cliver par la rénine, une endopeptidase, qui est produite par les cellules juxtaglomérulaires suivant une diminution du débit de perfusion dans cette région (Nguyen *et al.*, 2002; Schmieder *et al.*, 2007; Weir et Dzau, 1999). Ce clivage génère l'angiotensine I, un décapeptide, qui est le précurseur de l'angiotensine II (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Schmieder *et al.*, 2007; Wolf, 2008). Ce système classiquement endocrine peut aussi fonctionner de façon paracrine et autocrine (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008). Suivant la voie classique, l'angiotensine I se fait cliver par une dipeptidyl carboxypeptidase nommée « enzyme de conversion d'angiotensine » (ECA) principalement retrouvée dans l'endothélium pulmonaire (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Schmieder *et al.*, 2007; Wolf, 2008).



**Figure 1.7 :** Le système rénine-Angiotensine-Aldostérone. Figure tirée et traduite à partir de [http://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotensin_system). La bioconversion de l'AngII à partir de l'angiotensinogène, sa régulation et les effets physiologiques de l'AngII.

Le produit résultant de ce dernier clivage est l'angiotensine II et celle-ci est un peptide actif qui contribue aux réponses physiologiques en activant les récepteurs hAT<sub>1</sub> et hAT<sub>2</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000; Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Wolf, 2008). La bioconversion d'angiotensine II peut se faire par des cheminements auxiliaires. La cathepsine D, le t-Pa (tissu plasminogen activator) et le « tonin » peuvent libérer l'angiotensine II à partir de l'angiotensinogène (Fleming *et al.*, 2006; Hunyady et Catt, 2006). La CAGE (Chymostatin-sensitive AngII-generating enzyme), la cathepsine G et le chymase peuvent aussi produire l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I (Fleming *et al.*, 2006; Hunyady et Catt, 2006).

L'angiotensine II via l'activation de hAT<sub>1</sub> contribue à augmenter l'activité sympathique de l'organisme, à augmenter la soif et de causer une contraction des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Weir et Dzau, 1999; Wolf, 2008). Elle cause la réabsorption des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> ainsi que l'excrétion du K<sup>+</sup> dans la cellule, cela provoque donc à une réabsorption d'eau par osmose (Weir et Dzau, 1999). Au niveau des cortex surrénaux, elle cause la libération d'aldostérone et celui-ci contribue aussi à la rétention d'eau (Weir et Dzau, 1999; Wolf, 2008). L'aldostérone, qui est un minéralocorticoïde, peut aussi augmenter l'expression d'hAT<sub>1</sub> (Jain *et al.*, 2009). Au niveau de l'adénohypophyse, l'angiotensine II cause la libération de l'hormone antidiurétique et celle-ci contribue aussi à une réabsorption d'eau (Weir et Dzau, 1999). Toutes ces composantes ont pour effet d'augmenter le volume et la pression sanguine. Suivant une perfusion juxtaglomérulaire élevée, s'enclenche une boucle de rétroaction qui inhibe la libération de la rénine (Fyhrquist

et Saijonmaa, 2008; Weir et Dzau, 1999). Les fonctions précises de chaque récepteur d'angiotensine II seront détaillées à la section 1.3.

### 1.2.2 Pathologie

Bien que les fonctions physiologiques du RAAS soient importantes pour l'homéostasie vasculaire et sodique, une perte de régulation peut mener à l'hypertension et d'autres pathologies. Les statistiques montrent que l'hypertension affecte 1 américain sur 4 et plus de 2/3 des hypertendus sont inadéquatement traités ((NCQA), 2007). L'hypertension est aussi parmi les causes de mortalité et de morbidité les plus importantes au monde. Un lien direct entre la concentration plasmatique d'angiotensine II et l'hypertrophie ventriculaire a été démontré (Schmieder *et al.*, 2007). Cette hypertrophie peut mener à une fibrillation atriale qui peut causer des arythmies cardiaques. Non seulement le RAAS est impliqué dans les pathologies telles que l'hypertension, il peut aussi causer le diabète de type 2, l'athérosclérose, le cancer, le stress oxydatif et diverses autres maladies cardiovasculaires (Fleming *et al.*, 2006; Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Hunyady et Catt, 2006; Schmieder *et al.*, 2007; Weir et Dzau, 1999; Wolf, 2008).

L'angiotensine II peut aussi favoriser l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire, le  $\text{nF-}\kappa\text{B}$  (Kranzhofer *et al.*, 1999). Ce dernier contribue à la pathologie de l'athérosclérose (Weir et Dzau, 1999). L'angiotensine II peut aussi agir négativement sur les ilots pancréatiques en diminuant l'apport sanguin, cela diminue

ensuite la production d'insuline, causant ainsi une hyperglycémie chronique liée au diabète de type II (Carlsson *et al.*, 1998). En ce qui concerne les cancers, l'angiotensine II peut contribuer à l'activation de métalloprotéinases qui favorisent l'invasion de cellules cancéreuses et à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires impliquées dans la néovascularisation. Cette dernière étant essentiel à l'apport des nutriments nécessaires à la prolifération des cellules tumorales (Hunyady et Catt, 2006; Schmieder *et al.*, 2007).

### **1.2.3 Pharmacologie**

Le RAAS peut être ciblé de plusieurs façons. Sur le marché pharmaceutique, il existe des inhibiteurs de la rénine, des diurétiques, des bloqueurs  $\beta$ , des inhibiteurs d'enzymes de conversion d'angiotensine, des antagonistes du récepteur d'aldostérone et des antagonistes du récepteur d'angiotensine II (Association, 2005; Gradman *et al.*, 2005; Israili, 2000; Jain *et al.*, 2009). Ces produits ont tous la capacité de réduire la pression artérielle, mais avec des intensités variables et ils ne sont pas équivalents dans leurs effets auxiliaires.

Les inhibiteurs de la rénine sont les plus récents à être introduits dans l'utilisation clinique. Il a été démontré que l'Aliskiren peut efficacement diminuer la pression artérielle en comparaison d'un placebo et est aussi efficace qu'un antagoniste du récepteur d'angiotensine II de type 1 (Gradman *et al.*, 2005). Ce composé a été obtenu par optimisation structurale à partir de la structure tridimensionnelle de la pochette de liaison du substrat de la rénine. Le médicament bloque la liaison de

l'angiotensinogène au domaine enzymatique de la rénine (Rahuel *et al.*, 2000). Les diurétiques diminuent le volume plasmatique total et ainsi diminuent la pression (Association, 2005). Les bloqueurs  $\beta$  sont des antagonistes des récepteurs adrénergiques et ils diminuent la fréquence et la force des contractions cardiaques (Association, 2005).

Les inhibiteurs des enzymes de conversion d'angiotensine étaient, jusqu'à l'introduction des antagonistes d'AT<sub>1</sub>, les plus utilisés pour le traitement de l'hypertension (Pham *et al.*, 1996). Ces inhibiteurs compétitionnent avec l'angiotensine II pour la liaison au site enzymatique des ACEs diminuant ainsi la concentration circulante d'angiotensine II. Il est à noter que l'ACE a plusieurs autres rôles physiologiques tels que la dégradation de la bradykinine et le Ac-SDKP (Bryant et Shariat-Madar, 2009; Peng *et al.*, 2005). Les antagonistes des récepteurs de minéralocorticoïde compétitionnent pour la liaison au récepteur. Il a été démontré que ces composés diminuent la pression sanguine et ils contribuent à inhiber certaines pathologies du RAAS telle que l'hypertrophie ventriculaire (Jain *et al.*, 2009).

Les antagonistes du récepteur d'angiotensine II de type 1 (ARA) sont actuellement parmi les plus utilisés cliniquement pour traiter l'hypertension. Ces composés compétitionnent avec l'angiotensine II pour la liaison sur hAT<sub>1</sub> (Timmermans, 1999). Le Losartan était le premier médicament approuvé sur le marché en 1996 (Ismail *et al.*, 2006). Comme le Losartan, les ARAs, tels que le Valsartan, l'Irbesartan et le Candesartan, ont une structure biphényle tétrazole ou biphényle carboxylate homologue (Cappelli *et al.*, 2008). Il a été démontré que certains de ces composés (tel le Losartan, le Eprosartan et le Telmisartan) compétitionnent réversiblement c'est-à-dire qu'ils peuvent déplacer une courbe dose-

réponse vers la droite. D'autres peuvent compétitionner irréversiblement (tel le EXP3174, Valsartan et Irbesartan) c'est-à-dire que non seulement ils déplacent la courbe, mais diminuent la réponse maximale suivant une surstimulation avec l'AngII (de Gasparo *et al.*, 2000; Fierens *et al.*, 1999). La différence entre les deux types précédemment présentés est que les antagonistes irréversibles se dissocient très lentement du récepteur hAT<sub>1</sub> (Fierens *et al.*, 1999).

### 1.3 Récepteurs de l'angiotensine II

#### 1.3.1 hAT<sub>1</sub>

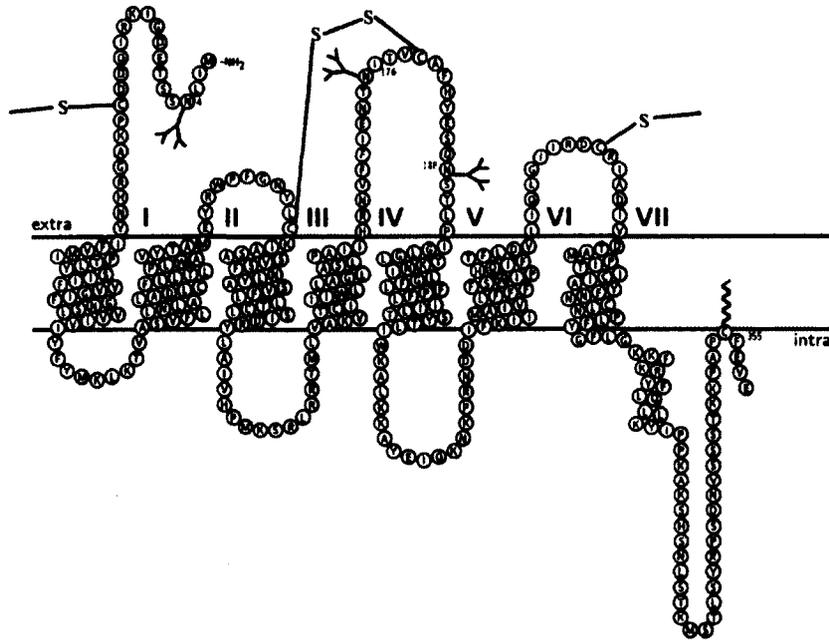
Le récepteur d'angiotensine II de type 1 fut le premier récepteur liant l'angiotensine II à être cloné et est le récepteur principal contribuant aux effets physiologiques de l'AngII (de Gasparo *et al.*, 2000). Il a été démontré que ce récepteur fut couplé aux protéines G<sub>q</sub> et G<sub>i</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000). Le récepteur hAT<sub>1</sub> a initialement été cloné à partir du matériel génétique du rat (*rattus norvegicus*) et du bœuf (*bos taurus*) au début des années 90s (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991). Les actions connues générées par ce récepteur sont la régulation de la pression artérielle, l'homéostasie sodique, la soif, l'activité neuronale sympathique, l'inflammation, la croissance et la prolifération cellulaire, la sécrétion d'hormones et diverses autres fonctions rénales (de Gasparo *et al.*, 2000; Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Schmieder *et al.*, 2007). Ce récepteur couplé aux protéines G sera exploré en

profondeur dans la section 1.4. Une représentation schématique est présentée à la figure 1.8.

### 1.3.2 hAT<sub>2</sub>

Le récepteur d'angiotensine II de type 2 (AT<sub>2</sub>) a été découvert suivant l'observation de la présence d'un site de liaison de l'AngII qui n'était pas affecté par le dithiothréitol comme c'est le cas avec AT<sub>1</sub> (Chiu *et al.*, 1989). Le clonage du récepteur AT<sub>2</sub> a démontré une seconde isoforme du récepteur à l'angiotensine II (Mukoyama *et al.*, 1993). Ce récepteur est distinct non seulement dans sa structure (moins de 35 % d'identité de séquence avec AT<sub>1</sub>), mais aussi dans ses effets physiologiques (de Gasparo *et al.*, 2000). Il a été montré que l'AngII peut se lier sur AT<sub>2</sub> avec une conformation semblable à AT<sub>1</sub> (Deraet *et al.*, 2002). Ce récepteur qui est aussi un RCPG est couplé principalement à G<sub>i</sub> et G<sub>o</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000). En effet, AT<sub>2</sub> est connu pour avoir une fonction d'antagonisme physiologique à AT<sub>1</sub> (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008). Les effets générés par le récepteur AT<sub>2</sub> sont la vasodilatation, la relâche d'oxyde nitrique (NO), l'inhibition de la prolifération et de la croissance cellulaire, l'apoptose et certains effets vasculoprotecteurs (Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Oliveira *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'activation de AT<sub>2</sub> chez le rat peut moduler son comportement (Hein *et al.*, 1995). Le gène codant pour hAT<sub>2</sub> (AGTR2) chez l'humain se retrouve au chromosome Xq22-q2 (de Gasparo *et al.*, 2000; Koike *et al.*, 1994). L'expression de ce récepteur est ubiquitaire chez le fœtus, mais diminue radicalement par la suite.

## Récepteur AT1



**Figure 1.8 :** Représentation schématique du type «Snake plot» du récepteur de l'Angiotensine II de type 1. Les sites de glycosylation sont indiqués avec des embranchements en noir, les ponts disulfures en rouge (entre le N-terminal et la troisième boucle extracellulaire et entre la première et la deuxième boucle) et le site de palmitoylation en zigzag noir. Les régions transmembranaires  $\alpha$ -hélicales approximatives ainsi que les milieux intra- et extracellulaires sont indiqués entre les lignes.

L'expression de AT<sub>2</sub> est très faible et quasi indétectable dans la majorité des tissus et impliquerait des méthodes de régulation très complexe distinctive aux tissus et à l'espèces (de Gasparo *et al.*, 2000). Le récepteur AT<sub>2</sub> est exprimé dans le cœur et dans l'endomètre utérin non fécondé (de Gasparo *et al.*, 2000; de Gasparo *et al.*, 1994). Le récepteur AT<sub>2</sub> s'avère désensibilisé suivant l'ajout d'un excès d'agonistes et s'internalise peu. Ceci est contraire au récepteur AT<sub>1</sub> qui se désensibilise rapidement (Oliveira *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Autres protéines liant l'angiotensine II

Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ne sont pas les seules protéines qui peuvent lier l'angiotensine II. Il a été démontré qu'il y a une protéine (non-AT<sub>1</sub>, non-AT<sub>2</sub>) qui peut lier l'AngII dans le cerveau du rat, de la souris et de l'humain (Chaki et Inagami, 1992; de Gasparo *et al.*, 2000; Karamyan et Speth, 2008; Karamyan *et al.*, 2008). Cette protéine ne semble pas être un RCPG. Il est intéressant à noter que le cerveau contient toutes les composantes du système rénine-angiotensine classique (de Gasparo *et al.*, 2000; Phillips et de Oliveira, 2008).

Les métalloprotéinases impliquées dans la maturation et la dégradation d'AngII telles que l'ECA, ECA2 et AMPA doivent aussi lier l'AngII pour accomplir leur fonction enzymatique (Speth et Karamyan, 2008). De plus, les protéines plasmatiques peuvent aussi lier de façon non spécifique les angiotensines.

## 1.4 hAT<sub>1</sub>

### 1.4.1 Séquences codantes

Le récepteur hAT<sub>1</sub> est produit à partir du gène AGTR1 qui est situé sur le chromosome 3q21 (de Gasparo *et al.*, 2000; Oro *et al.*, 2007). Ce gène est composé de 5 exons dont la séquence codante est complètement située sur le dernier codon en aval (Oro *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2005). Les autres exons sont variablement transcrits en fonction du contexte cellulaire pour réguler la traduction d'hAT<sub>1</sub> (Elton et Martin, 2003; Oro *et al.*, 2007). Le récepteur peut aussi subir un épissage alternatif pour former un plus long AT<sub>1</sub> en N-terminal qui maintient toujours sa fonctionnalité (Curnow *et al.*, 1995).

Le récepteur est composé de 359 acides aminés dont la structure primaire est représentée dans les figures 1.5 et 1.8. Il comprend aussi 9 méthionines endogènes importantes pour l'application du MPA et la digestion au CNBr. Voir section 1.5.2. Le récepteur humain a une séquence d'identité de 95 % avec celui du bœuf et ceux du rat (Curnow *et al.*, 1992; de Gasparo *et al.*, 2000). Le récepteur hAT<sub>1</sub> a environ 20 % d'homologie avec la rhodopsine et les autres récepteurs de cette famille, cependant cette homologie est principalement, sinon exclusivement, retrouvée dans les DTMs (voir figure 1.5) (Ballesteros *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2007). Ainsi, la modélisation des récepteurs par homologie avec les DTMs est valide, mais les divergences sont plus importantes dans les domaines extramembranaires. Par conséquent, leur modélisation est plus difficile et pourrait nécessiter une combinaison de modèles cristallographiques et computationnels (de Graaf *et al.*, 2008; Mehler *et al.*, 2002;

Worth *et al.*, 2009). Le récepteur hAT<sub>1</sub> comprend tous les résidus les plus conservés dans les DTMs tels que les motifs DRY et NPxxY qui permettent aussi l'alignement de séquence et la modélisation par homologie (Ballesteros *et al.*, 2001; Costanzi, 2008; Flower, 1999; Oliveira *et al.*, 2007). Ces résidus utilisés pour l'alignement sont Asn 55 (1.50), Asp 83 (2.50), Arg 135 (3.50), Trp 161 (4.50), Pro 215 (5.50), Pro 267 (6.50) et Pro 303 (7.50) dans la rhodopsine qui correspondent à Asn 46 (1.50), Asp 74 (2.50), Arg 126 (3.50), Trp 153 (4.50), Pro 207 (5.50), Pro 255 (6.50) et Pro 299 (7.50) dans le récepteur hAT<sub>1</sub> (Ballesteros *et al.*, 2001; Clement *et al.*, 2005; Palczewski *et al.*, 2000).

#### 1.4.2 Structure

Comme tous les RCPGs, le récepteur hAT<sub>1</sub> a une structure heptahélicale. À l'instar des autres récepteurs de la famille rhodopsine, le récepteur hAT<sub>1</sub> possède un pont disulfure entre la première et la deuxième boucle extracellulaire. De plus, il possède un deuxième pont disulfure entre la troisième boucle extracellulaire et le N-terminal qui le rend sensible à une dénaturation réductrice par le dithiothréitol et l'acide ascorbique (Chiu *et al.*, 1989; de Gasparo *et al.*, 2000; Leclerc *et al.*, 2008).

Trois sites de N-Glycosylations existent sur le récepteur hAT<sub>1</sub>. Le premier est situé sur le N-terminal. Les deux autres sites se retrouvent au niveau de la deuxième boucle extracellulaire (de Gasparo *et al.*, 2000; Lanctot *et al.*, 2005; Lanctot *et al.*, 1999). Chacune de ces glycosylations est importante pour l'expression d'hAT<sub>1</sub>

(Lanctot *et al.*, 2005; Lanctot *et al.*, 1999). Le récepteur possède un site de palmitoylation hautement conservé dans la queue C-terminal qui oriente celui-ci ainsi que l'hélice 8 cytosolique afin qu'ils puissent bien interagir avec la protéine G (Altenbach *et al.*, 1999). Cette queue cytoplasmique comprend aussi un motif  $\phi X\phi XXXX\phi XX\phi$  (où  $\phi$  est un résidu aromatique) qui est connu pour lier la calvéoline (Leclerc *et al.*, 2002). La queue C-terminal comporte aussi un domaine liant la calmoduline/ $Ca^{2+}$  et participe à la liaison des  $\beta$ -arrestines (arrestine 2 et 3) (Qian *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 1999). Ces arrestines lient le récepteur AT<sub>1</sub> suite à la phosphorylation de la thréonine et la sérine situées dans le C terminal et dans les boucles intracellulaires (de Gasparo *et al.*, 2000; Hunyady, 1999; Qian *et al.*, 2001; Thomas et Qian, 2003). Ces résidus se font phosphoryler par des RCPG kinases et la PKC (de Gasparo *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2007). Une mutation ou une troncation en amont de ces résidus empêche la liaison des arrestines et l'internalisation subséquente du récepteur (Hunyady, 1999; Qian *et al.*, 2001; Thomas et Qian, 2003). Le récepteur possède aussi un site de S-nitrosylation présent dans le haut du DTMVII à la position 289C (Leclerc *et al.*, 2006).

Il a été postulé que le récepteur hAT<sub>1</sub> peut s'hétérodimériser avec le récepteur hAT<sub>2</sub>, avec le récepteur de la bradikynine B<sub>2</sub>, avec le récepteur Mas et avec le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique (AbdAlla *et al.*, 2001; AbdAlla *et al.*, 2000; Barki-Harrington *et al.*, 2003; Kostenis *et al.*, 2005; Oro *et al.*, 2007). Il existe, dépendant du récepteur, une modulation allostérique positive ou négative pour l'efficacité et l'affinité de l'hétérodimère envers l'AngII (Oro *et al.*, 2007).

La relation structure-activité de l'AngII (Asp, Arg, Val, Tyr, Ile, His, Pro, Phe; séquence humaine) est importante pour la compréhension de la liaison et l'activation

d'hAT<sub>1</sub>. Certains résidus de l'AngII peuvent être modifiés sans perte d'affinité et/ou d'efficacité. La substitution de certains résidus de l'AngII pour la stabilisation ou pour l'insertion de groupement réactif nous permet de créer des analogues qui se lient avec forte affinité sur le récepteur hAT<sub>1</sub>. Deux de ces analogues, très importants pour cette étude, sont le [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII et le [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (Bosse *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1974). Les analogues d'AngII ont grandement ouvert les horizons de l'étude du récepteur hAT<sub>1</sub>. Les positions Arg<sup>2</sup>, Tyr<sup>4</sup>, His<sup>6</sup> et Phe<sup>8</sup> ont été identifiées comme étant importantes pour l'affinité et l'activation du récepteur hAT<sub>1</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000). Parmi ces résidus, la position 8 peut être modifiée tout en maintenant l'affinité des analogues, mais avec une perte d'activité principalement si le groupement aromatique du Phe<sup>8</sup> est enlevé (de Gasparo *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 1974). La modification en N-terminal (Asp<sup>1</sup>) peut affecter l'affinité et la demi-vie du peptide *in vivo*, mais n'est pas importante pour l'activation de hAT<sub>1</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000). Ceci est le cas pour le [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII dont l'affinité est un peu augmentée, mais l'activité agoniste sur WT hAT<sub>1</sub> est perdue (de Gasparo *et al.*, 2000; Khosla *et al.*, 1974). L'AngIII (DesAsp<sup>1</sup> AngII) demeure toujours agoniste sur hAT<sub>1</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000; Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Hunyady et Catt, 2006). La modification des positions 1, 3, 5, 7 est plus permissive face au maintien la structure-activité envers hAT<sub>1</sub> suivant leur substitution, en particulier sur le récepteur constitutivement actif N111G (voir section 1.4.4) (de Gasparo *et al.*, 2000; Fillion *et al.*, 2010). La conformation de l'AngII en solution a été étudiée par RMN et une structure en forme de «β-hairpin» a été observée (Nikiforovich *et al.*, 1994; Nikiforovich et Marshall, 1993). Il est à noter que la conformation en solution pourrait bien différer de la conformation en complexe AngII-hAT<sub>1</sub>.

Plusieurs résidus du récepteur hAT<sub>1</sub> participent à la liaison avec l'AngII et de ses analogues. Grâce à des études de liaisons en combinaison avec de la mutagenèse dirigée, les résidus 14I, 24H, 27I, 92Y, 102K, 105S, 111N, 167R, 179V, 183H, 199K, 253W, 259F, 263D, 278D, 281D et 301F ont été identifiés comme étant impliqués dans la liaison. (de Gasparo *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2003). Notamment, il a été trouvé que le carboxylate du C-terminal peut interagir avec le 199K (de Gasparo *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). Malgré ces résultats, il est quand même difficile de différencier une perte de stabilité structurale de la conformation native du récepteur ayant une interaction directe avec l'AngII. Les études de photomarquage par affinité, en étudiant l'interaction directe entre le ligand et le récepteur, ont permis de contourner ce problème. Le résidu en C-terminal de l'AngII interagirait profondément à l'intérieur des domaines transmembranaires en particulier avec les résidus 293 (7.44) et 294 (7.45) dans le DTMVII. Ceci a pu être observé par la substitution du Phe<sup>8</sup> pour le Bpa<sup>8</sup> photolabile (Perodin *et al.*, 2002). Le résidu 7.43 correspond au point d'attachement du rétinol (297L) dans la rhodopsine (Perodin *et al.*, 2002). Il a été montré par photomarquage que la position 3 de l'AngII lie le résidu 167 dans la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire (Boucard *et al.*, 2000).

Aussi, la corrélation de ces deux études a mené à la postulation d'une conformation étendue de l'AngII à l'intérieur du récepteur (Boucard *et al.*, 2000; Deraet *et al.*, 2002). Ce constat a été fait malgré que l'orientation et la conformation de la 2<sup>e</sup> boucle extracellulaire n'étaient pas résolues. Les études de SCAM ont aussi permis d'identifier plusieurs résidus de hAT<sub>1</sub> qui pourraient affecter la liaison du <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. Bien que ces résultats ne puissent pas confirmer une interaction directe entre le ligand et le récepteur, ils peuvent néanmoins permettre

d'identifier les résidus qui sont orientés vers la pochette de liaison. Ainsi, Ces études ont identifié les résidus M30C, T33C, D74C, T81C, L83C, A85C, T88C, A89C, A104C, L112C, V169C, L197C, N200C, I201C, G203C, F204C, A244C, F249C, H256C, T260C, V264C, A277C, V280C, T282C, A283C, I286C, A291C et F301C comme étant orientés vers la pochette de liaison de l'AngII sur hAT<sub>1</sub> (Boucard *et al.*, 2003; Domazet *et al.*, 2009; Domazet *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009). De plus, ces résultats peuvent donner de l'information sur l'activation du récepteur, ceci en combinaison avec la mutation constitutivement active (CAM) N111G (voir section 1.4.3 et 1.4.4).

Les antagonistes non peptidiques, ARA ou les « sartans » compétitionnent pour le même site de liaison que l'AngII. L'interaction des ARA avec hAT<sub>1</sub> est semblable à l'interaction de l'AngII avec hAT<sub>1</sub>, mais elle n'est pas identique (de Gasparo *et al.*, 2000). Les résidus 102K, 108V, 163A, 192P, 198T, 199K, 252S, 300L et 301F ont été identifiés par mutagenèse dirigée et par dynamisme moléculaire comme étant importants pour la liaison des antagonistes non peptidiques (de Gasparo *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 1994; Noda *et al.*, 1995; Tuccinardi *et al.*, 2006). Le groupe tétrazole ou carboxylate interagit avec le 199K tel que le C-terminal de l'AngII (Noda *et al.*, 1995; Tuccinardi *et al.*, 2006). Parmi ces résidus la mutation à la position 163A a aussi été identifiée comme polymorphisme du gène AGTR1 et elle affecterait la liaison du Losartan sur le récepteur hAT<sub>1</sub> (Arsenault *et al.*, 2010; Gosselin *et al.*, 2000).

### 1.4.3 Activation

Comme tous les RCPGs qui activent les protéines  $G_{q/11}$  (voir section 1.1.3), l'activation du récepteur  $hAT_1$  signale principalement via la phospholypase C (PLC) par l'intermédiaire de ces protéines G (de Gasparo *et al.*, 2000). La PLC hydrolyse le  $PIP_2$  en DAG et en  $IP_3$ . L' $IP_3$  active les récepteurs canaux à la membrane du réticulum endoplasmique et provoquera une entrée de calcium dans le cytosol (Mizuno et Itoh, 2009). Le calcium activera la calmoduline ainsi que la calmoduline kinase et il activera la PKC à l'aide du DAG comme co-activateur (Mizuno et Itoh, 2009; Thomas *et al.*, 1999). Le PKC et la calmoduline kinase vont phosphoryler les protéines cibles selon le contexte cellulaire pour moduler leur activité (Mizuno et Itoh, 2009). La libération de calcium est en général un signal trophique et cause aussi une contraction chez les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins. Ceci est provoqué par la stimulation des chaînes légères de myosine (Fleming *et al.*, 2006; Fyhrquist et Saijonmaa, 2008; Hunyady et Catt, 2006; Oliveira *et al.*, 2007).

Pour activer la protéine  $G_{q/11}$ , le récepteur doit se convertir en sa forme active. Cela nécessite certains gains et pertes d'interactions intramoléculaires pour mener à une conformation active (Gether et Kobilka, 1998). Cette conformation active serait semblable sinon identique aux formes actives des autres RCPGs de la famille rhodopsine (Ballesteros *et al.*, 2001; Gether et Kobilka, 1998; Salom *et al.*, 2006). Certains résidus dans les DTMs sont importants pour l'activation de  $hAT_1$ . Ceci est le cas pour le 74D (2.50), car la perte de ce résidu abolit l'activation (Nikiforovich *et al.*, 2006). Une mutation du résidu 111N mène à une activation constitutive (Auger-Messier *et al.*, 2004; Auger-Messier *et al.*, 2003; Auger-Messier *et al.*, 2005; Feng *et*

*al.*, 1998; Nikiforovich *et al.*, 2005) (voir section 1.4.4). La position Tyr<sup>4</sup> de l'AngII avait été présumé pour interagir avec le résidu 111N dans hAT<sub>1</sub> (Miura *et al.*, 1999), cependant la modélisation moléculaire de la position 3 de l'AngII réfute cette possibilité (Boucard *et al.*, 2000). Étant donné que la position 4 de l'AngII ne serait pas capable de pénétrer aussi loin à l'intérieur des TMs. Le motif D(E)RY s'avère crucial pour l'activation des RCPGs dans la famille rhodopsine (Alewijjnse *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2008). Le motif 125D, 126R, 127Y (3.49-3.51) est aussi important pour l'activation d'hAT<sub>1</sub> et il formerait une liaison hydrogène ou un pont salin avec 215Y (5.58) et 236D (6.31) qui serait l'homologue de 297E (6.30) dans la rhodopsine (Baldwin *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 2008). Le résidu 253W (6.48) est important pour l'activation de hAT<sub>1</sub>, selon la théorie du « rotamer toggle » ou le « tryptophan switch » (Ahuja et Smith, 2009; Miura *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2002). La proline en position i+2 (où i désigne l'unité peptidique) (6.50) du résidu 253 (6.48) serait importante pour ce mécanisme permettant un pli dans le haut du DTMVI crucial pour son orientation (Shi *et al.*, 2002). Le domaine NPxxY, qui est aussi parmi les motifs les plus conservés dans les RCPGs de la famille rhodopsine, serait aussi impliqué dans l'activation du récepteur (Ahuja et Smith, 2009; Shi *et al.*, 2002). Des études de mutagenèse ont montré que la mutation de ces résidus abolît pleinement ou partiellement l'activation et l'expression de ces récepteurs (Fritze *et al.*, 2003). Le gain et la perte d'interactions de ces résidus suivant la liaison d'un agoniste seraient nécessaires aux évènements menant à l'activation d'hAT<sub>1</sub>.

De plus, le récepteur hAT<sub>1</sub> pourrait fonctionner comme un senseur de pression (Hunyady et Catt, 2006; Zou *et al.*, 2004). Le stress mécanique peut activer le

récepteur hAT<sub>1</sub> en absence d'AngII suivant son cheminement signalétique classique et peut contribuer à l'hypertrophie cardiaque *in vivo* (Zou *et al.*, 2004).

Certaines protéines peuvent moduler l'activation du récepteur hAT<sub>1</sub>. Les protéines telles que « AT<sub>1</sub> receptor associated protein » (ATRAP), « Angiotensin II receptor associated protein » (ARAP) et « GDP/GTP exchange factor like protein » (GLP) ont été identifiées comme pouvant lier hAT<sub>1</sub>. Ces protéines peuvent moduler l'expression et la signalisation de hAT<sub>1</sub> (Hunyady et Catt, 2006).

Plusieurs changements conformationnels ont déjà été suggérés comme participant dans le mécanisme d'activation d'hAT<sub>1</sub> et des RCPGs de la famille rhodopsine. Les études de SCAM sur hAT<sub>1</sub>, qui analysent les variations d'affinité de liaison par l'ajout de groupements chargés dirigé sur des cystéines mutées de façon stratégique dans le récepteur, ont démontré des différences entre le récepteur natif et constitutivement actif. Parmi les différences rapportées, les études précédentes ont suggéré les changements suivant durant l'activation constitutive. Le DTMVII s'éloigne de la pochette de liaison, le DTMIII ferait une rotation antihoraire, le DTMVI ferait aussi une rotation antihoraire, mais avec un pivot intégral rapprochant le haut (extracellulaire) et éloignant le bas (intracellulaire), le DTMII ferait aussi un pivot intégral rapprochant le haut et éloignant le bas, le DTMV ferait une rotation antihoraire. Les DTMI et IV participeraient peu ou pas dans le mécanisme d'activation (Boucard *et al.*, 2003; Domazet *et al.*, 2009; Domazet *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009). En comparaison avec d'autres RCPGs de la famille rhodopsine, on retrouverait des changements conformationnels semblables. Le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique analysé par spectrophotométrie de fluorophores liés sur des cystéines mutées aurait aussi observé des rotations

antihoraires du DTMIII et VI (Gether, 2000; Gether *et al.*, 1997). La cristallisation de la forme MétaII de la rhodopsine a aussi donné de l'information très importante sur le mécanisme d'activation de la rhodopsine (Salom *et al.*, 2006). Bien que les changements entre la rhodopsine et la métarhodopsine II soient minimes (près de la limite de résolution), des changements de conformation ont été observé dans les boucles intracellulaires 2 et 3. Ces changements pourraient mener à une conformation qui lie la protéine G<sub>i</sub> (Salom *et al.*, 2006). Cependant, d'autres études ont observé un déplacement extérieur de la boucle extracellulaire 2 avec le haut du DTMV, une rotation antihoraire et un déplacement vers l'extérieur du DTMVI et un rapprochement du DTMVII (Ahuja et Smith, 2009). De plus, la rhodopsine dans son état actif aurait une conformation globale plus ouverte (Bhattacharya *et al.*, 2008). L'amplitude de ces changements conformationnels pourrait être un facteur discriminant un agoniste partiel d'un agoniste complet (Ahuja et Smith, 2009). Il est important d'étudier ces mécanismes d'activation dans le but de concevoir par approche structurale rationnelle un ligand avec une activité voulue (agoniste inverse, antagoniste, agoniste partiel ou complet) dans un chemin d'activation précis.

#### **1.4.4 Mutants constitutivement actifs et inactifs**

Il a été montré que, plusieurs récepteurs couplés aux protéines G ont une activité constitutive, c'est-à-dire qu'ils peuvent adopter une conformation active en absence d'un agoniste (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). De plus, certains

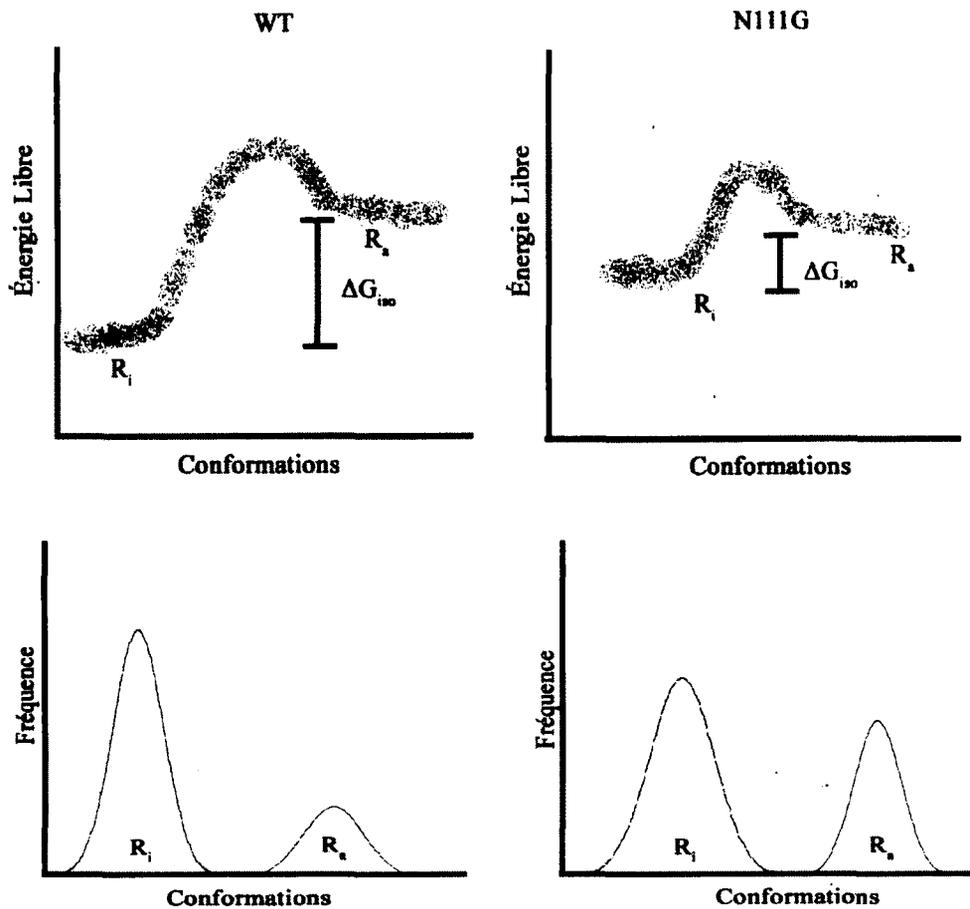
polymorphismes, troncations et épissages alternatifs peuvent mener à une activité constitutive et contribuer à certaines pathologies telles que l'aveuglement de nuit congénitale (rhodopsine), la formation de cancer gastrique (récepteur de la cholécystokinine) et la puberté précoce (récepteur de l'hormone lutéinisante) (Kopin *et al.*, 2000; Latronico *et al.*, 1998; Rao *et al.*, 1994; Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). L'utilisation d'agoniste inverse pourrait remédier à de nombreuses pathologies induites par des RCPGs constitutivement actifs (Kenakin, 2001; Seifert et Wenzel-Seifert, 2002).

Le récepteur hAT<sub>1</sub> peut être muté au résidu 111N (3.35) pour former un mutant constitutivement actif (CAM), c'est-à-dire qu'il peut activer fortement la voie G<sub>q</sub> en absence d'un agoniste. La position 111N (3.35) stabilise le récepteur dans sa conformation inactive (Auger-Messier *et al.*, 2003). Ce résidu aurait des interactions avec le résidu 292Y (7.43) (Joseph *et al.*, 1995) et/ou 74D (2.50). Le pont hydrogène entre le 3.35 et le 2.50 a été identifié suite à une étude de SCAM, de mutagenèse et de modélisation moléculaire du récepteur  $\delta$ -opioïde (un récepteur à très haute activité constitutive) et dans le récepteur d'histamine H<sub>1</sub> (Jongejan *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2005). La substitution du résidu 111N par un petit acide aminé moins encombrant, ne pouvant pas former des liens hydrogènes, serait la cause de cette déstabilisation (Feng *et al.*, 1998; Nikiforovich *et al.*, 2005). Avec une forme inactive déstabilisée, l'énergie d'isomérisation ( $\Delta G_{iso}$ ) entre la forme active et inactive serait diminuée et ceci aurait comme résultats d'augmenter la population de la forme active (R<sub>a</sub>) par rapport à la forme inactive (R<sub>i</sub>) (voir figure 1.9 et section 1.5.4).

L'utilisation des récepteurs N111G hAT<sub>1</sub> a démontré qu'il y avait un seul état à haute affinité pour l'agoniste AngII tandis que le WT hAT<sub>1</sub> possède deux états (avec

ou sans la modulation allostérique de la protéine G). Le N111G maintiendrait son état à haute affinité envers l'agoniste  $^{125}\text{I}$ -AngII avec ou sans la protéine G (voir section 1.1.5) (Auger-Messier *et al.*, 2003). De plus, l'activation constitutive soutenue diminue l'expression des récepteurs à l' $\text{IP}_3$  changeant ainsi la morphologie des cellules HEK-293 qui exprime le récepteur N111G hAT<sub>1</sub> de façon stable (Auger-Messier *et al.*, 2004; Auger-Messier *et al.*, 2005). Certains agonistes ont une affinité plus élevée pour le récepteur constitutivement actif. Ceci est le cas pour l'AngII et l'AngIV (Auger-Messier *et al.*, 2003; Le *et al.*, 2002). De plus, le [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII et le [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>4</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII qui sont des antagonistes neutres sur WT hAT<sub>1</sub> deviennent agonistes complets sur N111G hAT<sub>1</sub> (Clement *et al.*, 2006; Nikiforovich *et al.*, 2005). La stimulation basale du N111G est augmentée, ce qui est démontré par son activité constitutive ainsi que son expression (Auger-Messier *et al.*, 2003). Le modèle N111G a subséquentement été utilisé comme modèle d'un récepteur davantage actif en comparaison avec le WT hAT<sub>1</sub> (Boucard *et al.*, 2003; Gether et Kobilka, 1998; Seifert et Wenzel-Seifert, 2002).

D'autres résidus une fois mutés sont connus pour causer une activité constitutive sur AT<sub>1</sub>. Ces résidus sont 77F, 78L, 107S, 110F, 111N, 112L, 118L, 142M, 143L, 162P, 173E, 193I, 195L, 198T, 245I, 253W, 295N et 305L (Nikiforovich *et al.*, 2005; Parnot *et al.*, 2000). De tous ces mutants, c'est la mutation unique de N111G qui démontre la plus haute activité constitutive (Nikiforovich *et al.*, 2005).



**Figure 1.9 :** Diagramme d'énergie libre entre le WT et N111G hAT<sub>1</sub>. Les barrières d'énergie déterminent la facilité et la fréquence de transition entre la forme inactive  $R_i$  et  $R_a$ . Le plateau d'énergie dont occupent ces conformations détermine la population de ces formes. Le  $\Delta G_{iso}$  correspond à la variation d'énergie entre ces plateaux.

La même position du N111G (3.35) sur hAT<sub>1</sub> peut aussi mener à un récepteur constitutivement inactif. Le N111W ne démontre aucune signalisation basale remarquable et presque pas d'activation suite à une stimulation par 100nM d'AngII tout en maintenant une affinité dans des concentration de quelques nM et une expression légèrement plus faible (Auger-Messier *et al.*, 2004; Auger-Messier *et al.*, 2003). La modélisation moléculaire préliminaire démontre que le tryptophane muté à la position 111 serait optimal pour former des interactions de Van der Waals avec les résidus 112L et 77F et il pourrait former une liaison hydrogène avec le 74D. Une surstabilisation de la forme inactive mènerait à une population plus importante de récepteur inactif et pourrait faire en sorte que la barrière d'activation soit insurmontable.

#### 1.4.5 Signalisation pléiotropique

La voie classique de hAT<sub>1</sub> qui active la protéine G<sub>q/11</sub> n'est guère le seul. Le récepteur AT<sub>1</sub> peut aussi activer les protéines G<sub>12/13</sub> et G<sub>i/o</sub> (de Gasparo *et al.*, 2000; Hunyady et Catt, 2006). La stimulation de G<sub>12/13</sub> par l'activation de hAT<sub>1</sub> causerait une réorganisation du cytosquelette impliqué dans la croissance des cellules musculaires lisses ainsi que leur migration dans la néovascularisation (Hunyady et Catt, 2006; Schiffrin et Touyz, 2004; Suzuki *et al.*, 2009). L'activation de G<sub>12/13</sub> peut être vue par résonance de plasmon en surface (SPR) par une contraction des HEK-293 (Cuerrier *et al.*, 2009).

L'activation de  $G_{i/o}$ , qui a été vu dans le rongeur (via  $rAT_{1a}$ ), contribue à la modulation de l'activation des canaux calcique voltage dépendant dans les cellules adrénocorticales (Hunyady et Catt, 2006; Maturana *et al.*, 1999). L'activation de  $hAT_1$  a aussi démontré une capacité de  $G_{\beta\gamma}$  à activer certaines tyrosines kinases telles que  $pp60^{c-src}$  et JAK2 (Luchtefeld *et al.*, 2001).

Il existe aussi des mécanismes d'activation indépendants de la protéine G. Plusieurs autres protéines ont démontré une interaction directe avec le récepteur  $hAT_1$ . La  $\beta$ -arrestine (arrestine 2 -3), qui est impliqué dans la désensibilisation et l'internalisation de  $hAT_1$  peut aussi servir de site d'ancrage et de signalosomes dans la voie des MAPKs (mitogen activated protein kinases) (Hunyady et Catt, 2006; Prossnitz, 2004; Thomas et Qian, 2003). Bien que les MAPKs se trouvent phosphoryler par cette voie, ils ne semblent pas activer la transcription de gènes au noyau. L'implication physiologique de ce cheminement n'est toujours pas clair, il serait possible que ce complexe serve à ségréger et empêcher la translocation de ces kinases au noyau (Hunyady et Catt, 2006; Thomas et Qian, 2003). De plus, il a été démontré que Jak2 pouvait lier directement et peut être activé par le récepteur  $hAT_1$  (Ali *et al.*, 1997). L'activation du cheminement Jak/STAT dans ce contexte mène à une croissance cellulaire indépendante de la signalisation calcique (Doan *et al.*, 2001; Hunyady et Catt, 2006).

Ce cheminement a aussi été associé, de façon *in vivo*, à l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (Booz *et al.*, 2002). Il peut aussi se produire une activation de Src par une interaction directe avec  $hAT_1$  qui mènerait à l'activation de MAPK ras dépendant (Hunyady et Catt, 2006). Le récepteur  $hAT_1$  peut aussi activer directement

Cdc42 (Cell Division Control protein 42) qui activerait le cheminement de JNK (janus kinase) (Hunyady et Catt, 2006).

L'activation de hAT<sub>1</sub> peut aussi causer une transactivation d'autres cheminements. Par exemple, l'activation du PKC par la voie G<sub>q/11</sub> peut activer les métalloprotéinase à la surface des cellules, qui peuvent cliver un proEGF (epidermal growth factor) en EGF et celle-ci, une fois libre, peut activer les récepteurs EGFRs (epidermal growth factor receptor) d'une façon autocrine et paracrine qui mènent à l'activation des MAPKs (Du *et al.*, 1996; Hunyady et Catt, 2006; Shah *et al.*, 2004). Certaines cellules, telles que les HEK-293, peuvent activer directement cette voie, sans nécessité de transactivation, via la PKC (Shah *et al.*, 2004).

## **1.5 Photomarquage**

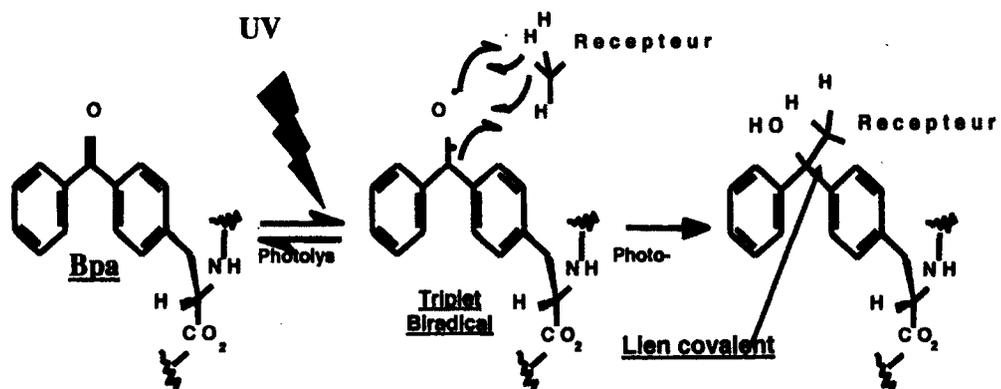
### **1.5.1 Bpa**

Les études de photomarquage ont été extrêmement utiles pour l'étude du récepteur hAT<sub>1</sub>. En remplaçant certains résidus du ligand hAT<sub>1</sub> tels que la phénylalanine en position 8 avec une molécule photolabile, plusieurs études ont été réalisables. L'identification des positions 293 et 294 dans hAT<sub>1</sub> a permis de mieux cerner l'interaction de l'AngII dans son complexe avec hAT<sub>1</sub> (Perodin *et al.*, 2002).

Le p-Benzoyl-L-phénylalanine (Bpa) est une des molécules photolabiles les plus utilisées en recherche (Bosse *et al.*, 1993; Breton *et al.*, 2001; Perodin *et al.*, 2002; Saviano *et al.*, 2004).

Le Bpa a certains avantages qui lui confèrent son utilité. Il est chimiquement beaucoup plus stable que d'autres groupements photolabiles tels que les azides et les diazérines (Fillion *et al.*, 2006; Gagnon *et al.*, 2006; Saviano *et al.*, 2004). Il peut être manipulé à la lumière ambiante et n'est qu'activé dans les longueurs d'onde de 350-360 nm (Saviano *et al.*, 2004). Ces longueurs d'onde ne sont normalement pas destructrices pour les protéines (Neves-Petersen *et al.*, 2002). Le Bpa réagit préférentiellement avec des liens C-H normalement non réactifs même en présence d'eau et de nucléophiles tout en maintenant une spécificité de liaison très bonne (Saviano *et al.*, 2004). Le Bpa forme un triplet biradical une fois irradié qui démontre une très bonne efficacité d'insertion par liaison covalente ou « cross-linking », car il y a très peu de perte par hydrolyse (Saviano *et al.*, 2004). Voir figure 1.10. De plus, ce résidu peut facilement être utilisé dans la synthèse peptidique (Bosse *et al.*, 1993). Il demeure stable dans les milieux réducteurs intracellulaires qui lui permettent d'être inséré comme acide aminé non canonique durant la synthèse protéique (Liu *et al.*, 2007). Le Bpa est très utile et versatile, pour toutes ces raisons.

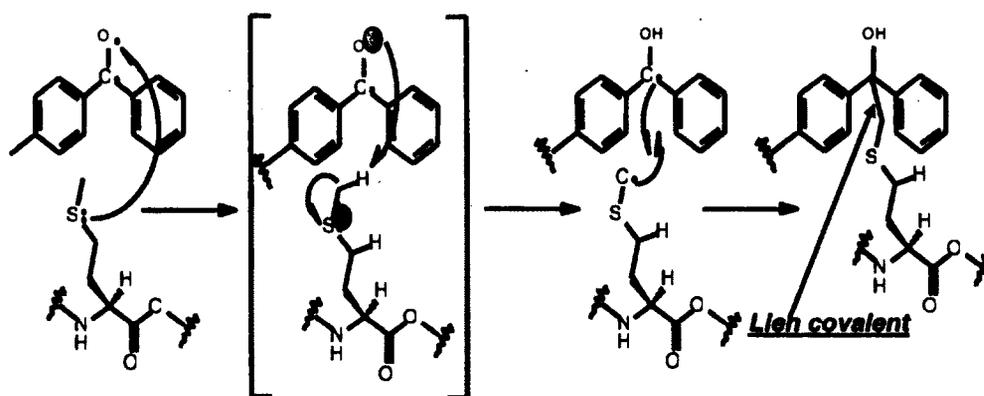
Bien que la formation d'un lien covalent indique un contact très rapproché, il est pratiquement impossible de déterminer avec précision la longueur du rayon d'action du Bpa. L'orientation des angles permis des carbones de la chaîne latérale et l'orientation de la cétone et des cycles aromatiques du Bpa, vont déterminer si le Bpa réagira avec la molécule cible (Kawamura *et al.*, 2008; Saviano *et al.*, 2004; Wittelsberger *et al.*, 2008).



**Figure 1.10 :** Structure et mécanisme de photolyse du Bpa. Une fois le Bpa irradié par la lumière UV, il y a formation de triplet biradical qui forme un lien covalent avec un atome environnant.

De plus, la flexibilité du complexe va aussi influencer l'amplitude des mouvements qui sont permis par le Bpa (Cozzini *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2008; Wittelsberger *et al.*, 2008). Dépendamment du contexte expérimental (flexibilité du complexe), le rayon d'action du Bpa pourrait être autant que 10 à 12 Å (Saviano *et al.*, 2004; Wittelsberger *et al.*, 2008). Le contenu en acide aminé dans l'environnement peut influencer le rayon d'action.

Le Bpa a été démontré comme étant sélectif pour les méthionines. Cette sélectivité reposerait sur la vitesse de réaction du Bpa envers les méthionines (Rihakova *et al.*, 2002; Wittelsberger *et al.*, 2006). Le Bpa a été démontré pour réagir dix milles fois plus rapidement avec une méthionine qu'avec une alanine (Marciniak *et al.*, 1993). Il est donc possible que le Bpa puisse favoriser la liaison avec une méthionine même quand il y a présence d'autres résidus plus près (Clement *et al.*, 2005; Rihakova *et al.*, 2002; Wittelsberger *et al.*, 2006). La formation d'un état de transition chargé diminue la barrière d'activation pour former les états subséquents (Marciniak *et al.*, 1993). L'état transitoire consiste en la formation d'un radical sulfonation sur la méthionine et un radical céto-anion sur le Bpa. Il se produit ensuite un échange de H<sup>+</sup> et la formation d'un lien covalent entre ces radicaux (Marciniak *et al.*, 1993). La figure 1.11 démontre le mécanisme radicalaire du Bpa pour une méthionine. Cet état de transition, qui diminue la barrière d'activation pour la formation de lien covalent, est théoriquement possible avec d'autres molécules qui contiennent un soufre bivalent (Marciniak *et al.*, 1993).



**Figure 1.11** : Mécanisme radicalaire entre Bpa et méthionine. L'état de transition noté par les [ ] démontre un complexe de transfert de charge qui facilite la formation de liens covalents entre la méthionine (bas) et le Bpa (haut).

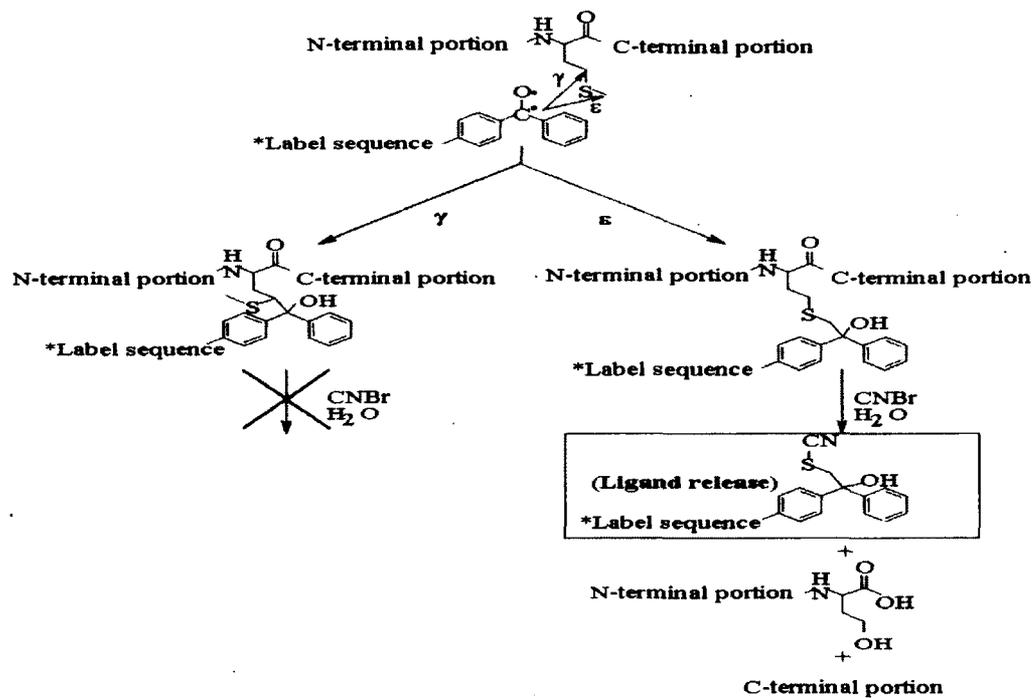
La sélectivité du Bpa pour les méthionines n'est pas un désavantage, mais plutôt ouvre la porte pour l'élaboration de nouvelles méthodes exploitant cette sélectivité.

### 1.5.2 MPA

L'essai de proximité aux méthionines (MPA) est basé sur la sélectivité du Bpa pour les méthionines. En combinant cette sélectivité de réaction avec une mutagenèse itérative des résidus du récepteur un à la fois pour une méthionine, il est possible de retrouver d'autres points de contact entre le ligand et le récepteur que le Bpa seul en complexe avec le récepteur natif ne pourrait pas retrouver (Rihakova *et al.*, 2002). La mutation en méthionine des points de contact retrouvés par dégradation d'Edman a aussi confirmé que les résidus F293M (7.44) et N294M (7.45) pouvaient interagir avec la position 8 du  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (Perodin *et al.*, 2002).

En combinant la mutagenèse dirigée de méthionine dans le récepteur avec la digestion chimique au CNBr qui clive le C-terminal des méthionines, il peut maintenant se produire un «high throughput» du récepteur (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005; Crimmins *et al.*, 2001; Rihakova *et al.*, 2002). Cela signifie que la digestion au CNBr permet de voir rapidement la formation de nouveaux fragments qui ne sont visibles que si le Bpa fait contact avec cette nouvelle méthionine. Généralement, la digestion chimique au CNBr produit de gros fragments, car il y a peu de méthionine en général dans les protéines (Crimmins *et al.*, 2001).

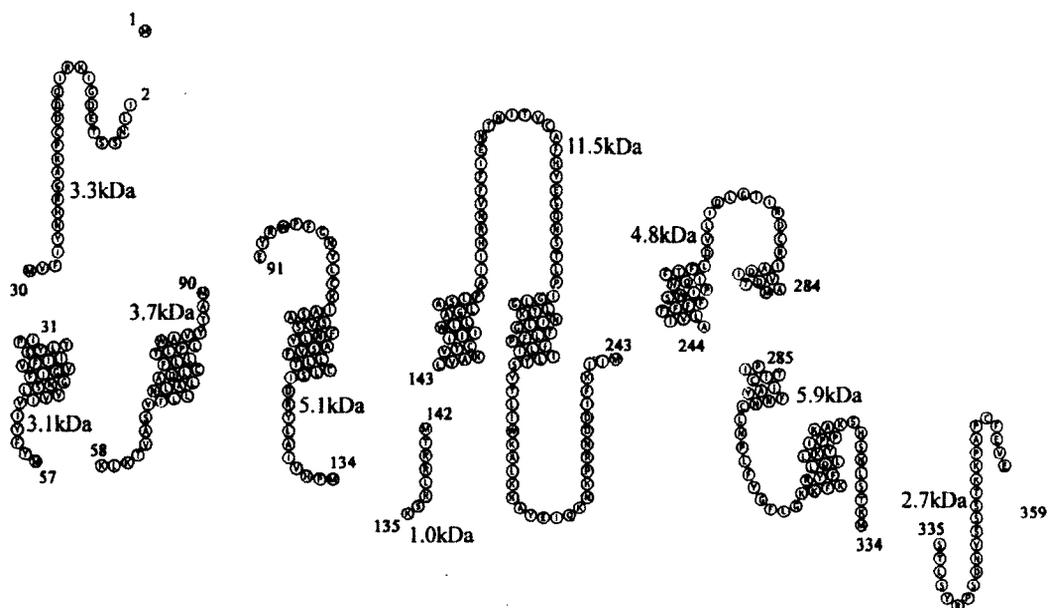
La benzophénone peut former un lien covalent avec le carbone  $\gamma$  ou  $\epsilon$  de la méthionine (Rihakova *et al.*, 2002). Alors deux réactions sont possibles. Si la benzophénone se lie sur le carbone  $\epsilon$ , l'adduit résultant de l'addition de la benzophénone et de la méthionine, sera clivé entre le soufre et le carbone  $\gamma$ . La réaction va donc produire une relâche du ligand (radioactif) avec un groupement isothiocyanate, le fragment N-terminal (non radioactif) et le fragment C-terminal (non radioactif). Si la benzophénone se lie sur le carbone  $\gamma$ , le CNBr ne peut cliver à cette position. Par contre, il se produira une libération de l'isothiocyanate- $\epsilon$ -méthyl de la chaîne latérale de la méthionine (non radioactif) (Rihakova *et al.*, 2002). Donc en marquant le carbone  $\gamma$  de la méthionine, la réaction de CNBr ne pourra cliver le résidu muté ni produire de nouveaux fragments (il va avoir une libération de fragments de taille native en absence de la méthionine mutée). Les méthionines marquées par le radiotracer  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII va montrer sur autoradiogramme une relâche de ligand et un marquage d'un fragment ayant la même taille qu'un fragment sans méthionine mutée (voir figure 1.12 pour ces réactions). Cependant, il est possible que la nouvelle méthionine puisse servir comme nouveau point de clivage pour le CNBr dans le cas où il se retrouve dans le fragment marqué nativement, c'est-à-dire entre les résidus 285-334 de hAT<sub>1</sub> (Clement *et al.*, 2005; Perodin *et al.*, 2002). D'autres digestions enzymatiques et chimiques peuvent être combinées au CNBr pour faciliter l'identification de nouvelles régions de contact (Boucard *et al.*, 2000; Laporte *et al.*, 1999).



**Figure 1.12 :** Digestion au CNBr de la protéine contenant des méthionines marquées au  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>Bpa<sup>8</sup>] AngII. Le Bpa peut se lier au carbone  $\epsilon$  ou  $\gamma$  résultant à la relâche du ligand radioactif et la production de fragments radiomarqués respectivement. Figure tirée de Clément *et al.*, 2005.

Suivant les digestions au CNBr, les fragments sont migrés sur gel SDS-PAGE (16,5 % acrylamide) séparer les fragments en fonction de leur masse. Le récepteur hAT<sub>1</sub> digéré par CNBr est illustré à la figure 1.13. La masse des fragments identifiés correspond à la masse du fragment du récepteur additionné de la masse du ligand radioactif soit 1,2 kDa. Seuls les fragments couplés au ligand radioactifs vont apparaître sur l'autoradiogramme. L'avantage d'un marquage radioactif est qu'il requiert qu'une faible concentration de protéine. Une telle concentration serait trop faible pour une méthode comme le marquage au bleu de Coumassis par exemple. Les deux fragments issus du marquage du DTMVII ont une masse de 7,1 et 10 kDa. Le fragment de 7,1 kDa correspond aux résidus 285-334 avec l'addition du ligand et le fragment de 10 kDa correspond à une digestion incomplète de la M334 dans la section de résidus 285-359 incluant l'addition du ligand (Clement *et al.*, 2005).

Le MPA a permis d'identifier plusieurs points de contact du <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII à l'intérieur de hAT<sub>1</sub>. La première étude a permis d'identifier les résidus L112M (3.36), Y113M (3.37), F249M (6.44), W253M (6.48), H256M (6.51), T260M (6.55), F293M (7.44), N294M (7.45), N295M (7.46), C296M (7.47) et L297M (7.48) comme pouvant interagir avec cet analogue d'AngII dans hAT<sub>1</sub> (Clement *et al.*, 2005). Tous les mutants de cette étude ont montré une activité semblable au WT suivant la stimulation par ajout 100nM d'AngII à l'exception du N294M qui n'avait aucune signalisation (Clement *et al.*, 2005). Suivant cette étude, en combinaison avec la mutation constitutivement active (N111G), les mêmes doubles mutants furent construits pour déterminer s'il y avait un changement dans la pochette de liaison chez une forme plus active de hAT<sub>1</sub>. Cette étude a permis de retrouver tous les mêmes points de contact sauf pour le N111G/T260M (3.35/6.55) (Clement *et al.*, 2006).



**Figure 1.13 :** Représentation schématique de hAT<sub>1</sub> suivant une digestion au CNBr avec les résidus et la taille (en kDa) des fragments impliqués. Les fragments perçus par autoradiogramme seraient un fragment seul ou la combinaison de plusieurs de ces fragments avec l'ajout du ligand radio marquée le <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII d'une masse de 1,3 kDa.

L'hypothèse proposée impliquerait potentiellement une pochette de liaison plus ouverte ainsi que l'éloignement du haut du DTMVI. La troisième étude de MPA sur hAT<sub>1</sub> et N111G hAT<sub>1</sub> a montré d'autres points de contact de la pochette de liaison. Cette étude a permis d'identifier les résidus F77M/N111G (2.53/3.35) et N111G/N200M (3.35/5.43) comme étant dans la pochette de liaison du récepteur constitutivement actif (Clement *et al.*, 2009). Ces deux doubles mutants (points de contact positifs au MPA) ont montré une activité constitutive significativement supérieure à leur homologue natif (Clement *et al.*, 2009). Tous les mutants positifs utilisés dans ces études ont montré une affinité semblable au [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII en utilisant le radiotracteur <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII. Bien que le MPA puisse correctement localiser des points de contact de l'analogue <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII dans la pochette de liaison, les différences entre le WT et le N111G retrouvées sont subtiles et les différences conformationnelles du mécanisme d'activation de hAT<sub>1</sub> approchent la limite de résolution de la méthode.

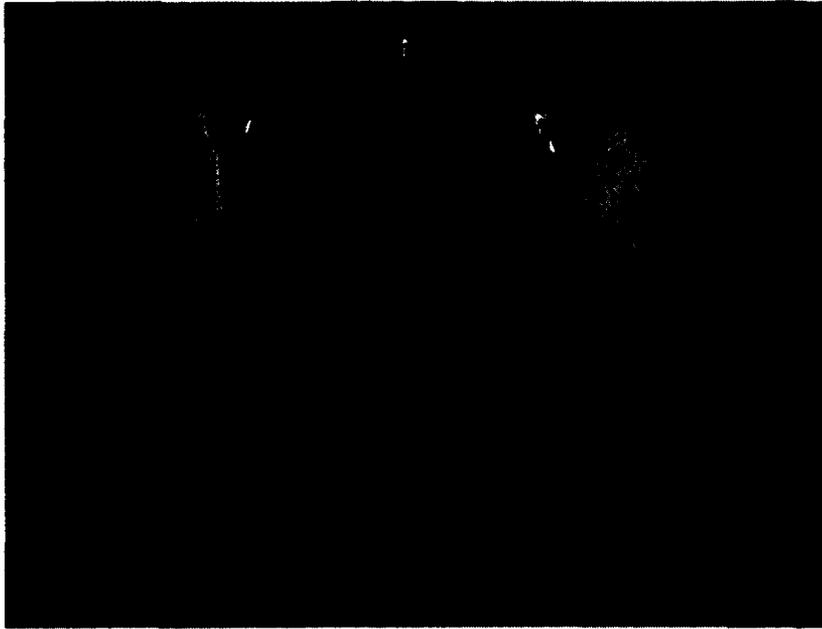
### 1.5.3 Variation, Reproductibilité et Problématique

Suivant l'étude de Clément *et al.* 2005, une certaine variabilité a été observée dans l'intensité des bandes, c'est-à-dire que l'intensité des bandes correspondant au DTMVII versus l'intensité des bandes correspondant, dans ce cas, au DTMVI (mutant H256M dans le DTMVI) était variable. Les résultats qualitatifs ne changeant pas, mais par contre la quantification des rapports d'intensités des bandes était variable. La méthodologie actuelle consistait à placer les récepteurs suspendus en solution dans

des pétris placés sur glace et irradiés par des lumières de 100W à approximativement 10 cm de distance (voir figure 1.14). Ces lampes peuvent grandement chauffer les échantillons et les variations observées pourraient être la résultante de petites modifications dans la distance entre l'échantillon et ces lampes. Nous avons donc postulé l'hypothèse suivante : la température pourrait affecter la région de photomarquage à l'intérieur du récepteur.

Étant donné que le rayon d'action du Bpa et sa sélectivité pour les méthionines restent controversés, la relation entre cette sélectivité et l'étendue des mouvements du complexe serait au moins en partie contrôlée par la température. Certaines études ont apporté des doutes concernant l'application efficace des informations structurales obtenues à partir du Bpa (Saviano *et al.*, 2004; Wittelsberger *et al.*, 2006). Non seulement certaines variabilités doivent être contrôlées pour apporter de la validité pour le MPA, mais tous les points de contact une fois apportés dans la modélisation par ordinateur peuvent être difficilement comparables. Les points de contact ne sont évidemment pas tous égaux. Nous avons donc besoin d'une façon efficace et reproductible pour quantifier ces points de contact. Le rendement de la réaction pourrait être une bonne démarche, cependant il faudrait corriger pour l'affinité du radiotraceur, l'expression du récepteur mutant, le rendement d'insertion du radiotraceur et l'intensité variable de chaque lampe. Tous ces facteurs rendent difficile la quantification des points de contact.

De plus, pour maintenir une validité physiologique les expériences de photomarquage devraient être faites à 37°C avant d'être testées à d'autres températures.



**Figure 1.14 :** Matériel de photolyse des expériences de MPA. Les échantillons sont placés dans un pétri sur glace et irradiés par une lampe à 100W.

Étant donné que les organismes homéothermiques ont évolué pour fonctionner à cette température, l'interaction entre le récepteur et le ligand endogène en complexe est aussi développée pour fonctionner à 37°C. Il est quand même surprenant que la température des analyses structurales ne soit pas systématiquement établie à cette température.

#### 1.5.4 Thermodynamique et nouvelle méthodologie

La température utilisée durant les expériences de fonctionnalité protéique est bien établie, cependant la relation entre la conformation de ces protéines et la température est toujours un peu ambiguë (Christopoulos et Kenakin, 2002; Freire, 1993; Kobilka et Schertler, 2008; Xie et Freire, 1994). Durant la cristallisation et l'analyse par diffraction des rayons X, la formation et la stabilité des cristaux dépendent beaucoup de la température. Lors des études réalisées sur la rhodopsine, une température de cristallisation d'approximativement 10°C fût employée (Okada *et al.*, 2004). Aussi, ces études ne montrent qu'une structure statique. L'étendue des mouvements thermodynamiques des RCPGs serait davantage utile pour l'approche rationnelle pharmacologique (Cozzini *et al.*, 2008; Kobilka et Schertler, 2008; Perozzo *et al.*, 2004).

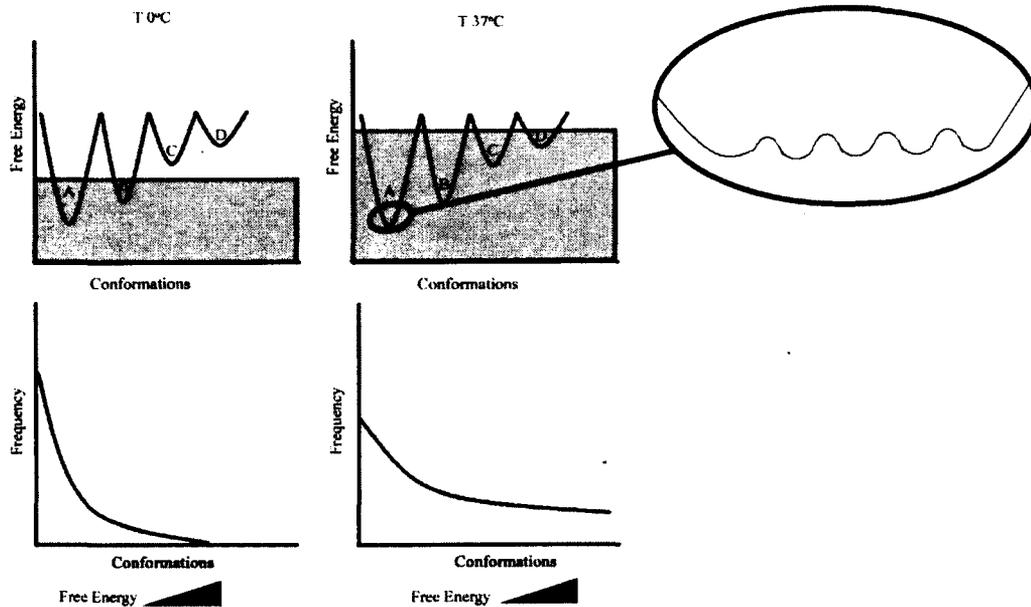
Étant donné que les RCPGs et les protéines en générales peuvent exister dans une panoplie de conformations difficilement envisageables, le contrôle thermodynamique est crucial (Kenakin, 2001; Kenakin, 2007; Kobilka et Deupi,

2007). L'interaction entre ligand et récepteur est gérée par l'entropie, l'enthalpie et la capacité calorifique (Freire, 1993; Li *et al.*, 2008; Perozzo *et al.*, 2004; Szwajkajzer et Carey, 1997). L'entropie, qui correspond au chaos du système, est directement proportionnelle à la température (Murphy, 1999). Quand un ligand se lie, il y aurait théoriquement une perte d'entropie, car l'étendue des mouvements du ligand en solution serait plus élevée que le ligand en complexe (Li *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 1994). Cependant, il a été démontré que l'étendue de mouvement du ligand en complexe est quand même très élevée (Cozzini *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 1994). L'enthalpie est l'énergie interne (ou chaleur) d'un système, dans ce cas le système serait le récepteur. Pour qu'un ligand se lie, il doit y avoir une enthalpie de complexe inférieure à l'enthalpie du ligand et du récepteur seul (Christopoulos et Kenakin, 2002; Freire, 1993). Le ligand doit briser ses liens avec l'eau pour en reformer avec le récepteur. L'enthalpie est aussi une fonction directe de la capacité calorifique des protéines étudiées. Celle-ci étant l'énergie nécessaire pour augmenter la température du système qui est géré par les modifications des résidus chargés et non chargés de la surface accessible au solvant (ASA) (Freire, 1993; Murphy, 1999). L'énergie libre de Gibbs est la résultante de ces variables (Freire, 1993; Murphy, 1999). La variation de l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) plutôt que la valeur absolue de ces valeurs est importante pour l'étude de l'interaction du complexe (Freire, 1993; Szwajkajzer et Carey, 1997). Une diminution de cette énergie favoriserait la formation du nouvel état plus stable. La population et la vitesse d'interconversion des états sont directement proportionnelles à l'énergie de Gibbs de ces conformations, leur barrière d'activation et leur variation d'énergie ( $\Delta G_{iso}$ ) (Christopoulos et Kenakin, 2002; Freire, 1993). Les températures plus basses favorisent les conformations plus stables tandis que les plus

hautes températures augmentent le nombre de conformations possibles ainsi que les variations microconformationnelles à l'intérieur d'un même état (voir figure 1.15).

Le rendement des réactions chimiques est aussi influencé par la température. Les tests enzymatiques sont systématiquement analysés à leur température fonctionnelle, car à plus basse température l'activité chute radicalement (Tousignant *et al.*, 1989). Une étude de photomarquage sur le récepteur de sécrétine et de calcitonine a démontré un gain de rendement de photomarquage suivant l'abaissement de la température de photolyse de 25 à 4°C (Dong et Miller, 2009). Le rendement de photomarquage peut être modulé en fonction de la température, cette tendance n'est pas unidirectionnelle par contre, car certaines études démontrent un gain, mais d'autres démontrent une perte (Dong et Miller, 2009). Une perte de capacité de liaison maximale à basse température a été observée sur le récepteur NK-1 (Tousignant *et al.*, 1989). Dans une autre étude, un autre groupe a photomarké la rhodopsine en utilisant un analogue du rétinol contenant une diazérine, le 3-diazo-4-oxo-11-cis-[15-<sup>3</sup>H] rétinol, à de basses températures dans l'ordre de -196°C (Souto *et al.*, 2000). Cette approche avait permis le photomarquage de la conformation active (lumi) de rhodopsine en la « figeant » d'une façon temporelle dans cette conformation avec des températures très basses.

Certains autres facteurs sont à considérer. L'affinité peut être affectée par la température. Cependant, quand l'équilibre de liaison est fait à des températures qui approchent 25°C, il se produit une compensation d'enthalpie/entropie. C'est-à-dire que ces deux composantes varient d'une façon proportionnelle et linéaire. Le résultat en  $\Delta G$  va être quasi identique (Winzor et Jackson, 2006).



**Figure 1.15 :** Théorème énergétique des conformations. Les températures faibles favorisent les conformations plus stables tandis que les températures plus élevées augmentent la diversité de conformations possibles ainsi que l'amplitude des variations microconformationnelles à l'intérieur d'un même état. Chaque puits correspond à une conformation et la région grise indique lesquelles de ces conformations sont accessibles aux températures données. Les graphiques du bas indiquent la fréquence des conformations en fonction de l'énergie libre de ces conformations.

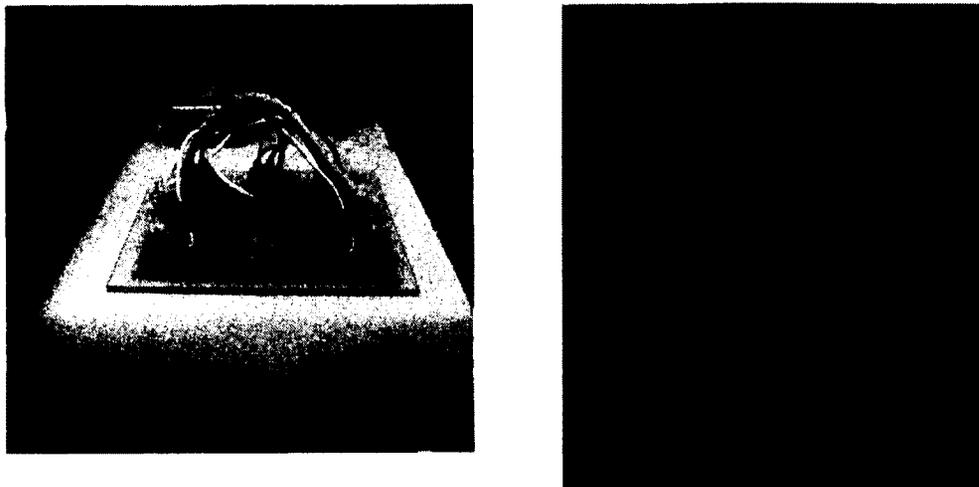
Cependant si la liaison nécessite une isomérisation importante du récepteur pour la liaison, comme un agoniste qui augmenterait la population de forme active, la contribution du  $\Delta G_{iso}$  pourrait affecter la liaison (si  $\Delta G_{iso} \gg \Delta G$  de la liaison). Ça serait donc récepteur et ligand dépendant, car la surface de la pochette de liaison (ASA) peut être modulée positivement ou négativement dépendant l'énergie libre de la conformation tertiaire du complexe. Bien que l'affinité soit un ratio de la constante de dissociation ( $k_{off}$ ) sur la constante d'association ( $k_{on}$ ), la température va affecter les deux composantes d'une façon proportionnelle. L'affinité pourrait donc être quasi identique, cependant le temps requis pour atteindre l'équilibre à basse température est grandement augmenté (Tousignant *et al.*, 1989; Winzor et Jackson, 2006). La température peut affecter le nombre de sites de liaison. Dans des tissus *ex vivo*, la quantité de récepteurs liés spécifiques ( $B_{max}$ ) de la substance P était diminuée à 4°C comparativement à 25 et 37°C (Tousignant *et al.*, 1989). Cette observation pourrait découler du fait que l'équilibre n'était pas atteint à 4°C en comparaison avec 25 et 37°C. Étant donné que l'équilibre et l'expression varient énormément en fonction de la température, une comparaison adéquate de l'affinité en fonction de la température d'incubation est très difficile à déterminer (Winzor et Jackson, 2006).

De plus, le pH d'une solution même avec un tampon sera diminué en fonction de la température. Une solution tampon de Trisma base (1M) dont le pH a été ajusté à  $7,4 \pm 0,1$  à 25°C va varier à  $8,0 \pm 0,1$  à 4°C jusqu'à  $6,8 \pm 0,1$  à 37°C. Une petite modulation du pH peut facilement changer la charge du récepteur et du ligand. L'AngII a une histidine en position 6 et le point isoélectrique (pI) de l'AngII est de 6,7 (Kuroda *et al.*, 2005). Il est donc important ici d'ajuster le pH du tampon à la

température d'analyse. Donc pour les études présentées dans cet ouvrage un tampon distinct a été produit pour chaque température de photolyse.

Afin de minimiser les variabilités qui adviennent de la chaleur des lampes durant le photomarquage, nous avons construit un nouvel appareil. Des lampes en spirales de plus faible intensité (13W au lieu de 100W) sont immergées partiellement dans un liquide circulant dans un incubateur. Les échantillons sont placés dans des éprouvettes en quartz et ces éprouvettes sont placées à l'intérieur de la cage spiralée des lampes. De plus, ces échantillons sont maintenus par gravité dans les lampes et ils s'ajustent à une distance identique pour toutes les expériences. Deux échantillons peuvent être placés par lampe ce qui permet de comparer deux échantillons entre eux plus précisément (on peut placer les mêmes mutants méthionine soit WT soit N111G dans la même lampe) ceci évite les variations possibles entre les lampes. Les échantillons sont irradiés par ces lampes, tout en étant maintenus dans le liquide thermiquement contrôlé. Des électrodes thermométriques ont été placées dans ces échantillons et la température de photolyse est maintenue à température constante avec une variation maximale de  $\pm 1$  °C de -10 à 40°C et de  $\pm 2$ °C de -20 à -10°C et de 40 à 50°C durant l'heure de photolyse. Voir figure 1.16.

La première étude présentée dans cet ouvrage démontre que la température peut bien changer les régions de contact du ligand par photomarquage. La seconde étude nous démontre comment tirer avantage de cette observation en élucidant des mécanismes d'activations du récepteur hAT<sub>1</sub> en photomarquant le CAM en comparaison avec le WT.



**Figure 1.16 :** Nouvel appareil de photomarquage. Les éprouvettes contenant l'échantillon sont placées dans la cage spirale des lampes (gauche) et les lampes sont immergées dans un liquide circulant thermiquement contrôlé d'un bain thermostaté (droite).

### 1.5.5 Quantification des points de contact

Les points de contact obtenus durant les études de MPA ne sont pas tous égaux. Certains résidus interagiraient directement avec le ligand tandis que d'autres ne seraient qu'orientés vers la pochette de liaison. Dans les modélisations précédentes, tous les points de contact ont été contraint à une distance de 7,5Å entre le Bpa et le résidu (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2005). Par contre, ceci peut apporter des rapprochements trop intenses pour certains résidus et d'autres résidus pourraient être plus loin qu'en réalité.

Pour quantifier les points de contact, nous allons utiliser la densitométrie et le dosage radioactif des gels directement sur compteur  $\gamma$ . En isolant les bandes qui correspondent au fragment du DTMVII (région native) et en isolant les bandes qui correspondent à la méthionine mutée des autres DTMs, il a été possible de quantifier les points de contact. Le dosage radioactif direct des gels serait la méthode la plus exacte pour obtenir les vraies valeurs en compte par minute (cpm). Cependant, la précision laisse à désirer, car il faut superposer l'autoradiogramme sur un gel dont on ne voit pas les fragments et il faut couper ces fragments précisément. La densitométrie réalisée avec l'aide d'Adobe Photoshop 7.0 nous permet de précisément contourner les bandes avec l'outil « magnetic lasso » et ensuite « Image/Histogramme ». Ces fonctions vont nous donner la taille, la luminosité moyenne (de 0 noir à 255 blanc), la médiane et l'écart type pour l'analyse densitométrique subséquente. Cependant, ces valeurs plus précises peuvent manquer d'exactitude si les bandes sont trop saturées ou trop -insaturées. Il est donc important dans ce cas de prendre plusieurs

autoradiogrammes d'un même gel pour s'assurer d'être dans la fenêtre optimale entre la sous-exposition et la surexposition. De plus, l'approche densitométrique permet de déterminer si le gel est surexposé ou sous-exposé. Car si la distribution des pixels est trop étendue entre les valeurs extrêmes (gros écart type) ceci va identifier un gel sous-exposé et si la distribution des pixels est concentrée vers 0 et n'a plus une allure gaussienne ceci va identifier un gel surexposé. Différents rapports entre la grosseur des bandes et la noirceur peuvent aussi être utilisés.

Le ratio de ces fragments, qui est directement proportionnel à l'accessibilité de la méthionine, nous donnerait une bonne indication de l'importance de chaque résidu testé. Ainsi, un signal élevé du photomarquage de la méthionine nous indiquerait un résidu plus accessible comparé à un signal faible du photomarquage d'une autre méthionine. En prenant un ratio du signal méthionine divisée par le signal du DTMVII (natif) nous pouvons négliger le rendement de la réaction de photolyse, le rendement de la digestion au CNBr, l'affinité du ligand photolabile et l'expression du récepteur. Les résidus MPA positifs F77M (2.53), L112M (3.36), Y113M (3.37), N200M (5.43), F249M (6.44), W253M (6.48), H256M (6.51), T260M (6.55) dans le récepteur 111N et N111G (3.35) ont été photomarqués à plusieurs températures pour analyser, dans un contexte thermodynamiquement fixé, leurs ratios d'accessibilités. Leurs ratios vont ensuite être convertis en une distance proportionnelle à cette accessibilité des méthionines mutées et ces distances hiérarchiques seront insérées comme contraintes en modélisation par refondu simulé (Charest et Lavigne, 2006). Cette méthode de modélisation repose sur le maintien des distances et des angles entre hélices  $\alpha$  des domaines transmembranaires suivis de plusieurs cycles de réchauffement et de refroidissement pour permettre aux chaînes latérales de

s'intercaler de façon « knobs into holes ». La séquence d'hAT<sub>1</sub> sera alignée par homologie à partir des résidus les plus conservés sur la structure de la rhodopsine obtenue à la plus haute résolution dans une étude précédente (PDB id : 1U19) (Okada *et al.*, 2004). Les résultats obtenus expérimentalement seront convertis en distance et seront insérés comme contrainte entre le carbone de la cétone du Bpa et le carbone  $\beta$  de la chaîne latérale du résidu impliqué.

L'hypothèse serait que nous sommes capables d'augmenter la résolution du MPA avec un contrôle thermodynamique des conformations du récepteur. Est-ce que nous pouvons observer des changements conformationnels entre le récepteur WT et le CAM en analysant les variations des accessibilités des résidus testés en fonction de l'activation du récepteur? Ces changements pourraient nous donner de l'information très pertinente concernant le mécanisme d'activation du récepteur hAT<sub>1</sub> et des RCPGs en général. Nous serons en mesure d'améliorer les connaissances sur la relation structure fonction de ce récepteur, de comprendre la flexibilité ainsi que l'étendue des mouvements du complexe ligand-récepteur et de potentiellement concevoir un ligand avec une activité voulue.

## **2.1 Article 1 : Avant propos**

Statut de l'article : publié

Référence : Arsenault, J., Renaud, M. P., Clement, M., Fillion, D., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. "Temperature-dependent variations of ligand-receptor contact points in hAT(1)." *J Pept Sci* **13**(9): 575-80(2007).

Apport: J'ai participé activement à l'élaboration de cette étude en planifiant et fournissant 90% des résultats présentés dans cet article. J'ai écrit le premier jet du manuscrit.

## 2.2 Article publié 1 : Résumé

Le photomarquage par affinité est régulièrement utilisé pour analyser des interactions entre ligand et récepteur et cela inclus les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). À cette fin, des ligands photolabiles ont été largement utilisés pour identifier des résidus dans la pochette de liaison. L'environnement tridimensionnel du récepteur humain de l'angiotensine II de type 1 (hAT<sub>1</sub>) a été investigué suivant une stratégie de mutagenèse itérative du récepteur hAT<sub>1</sub> qui repose sur la sélectivité des benzophénones pour les méthionines. Ceci a permis un modèle du complexe ligand récepteur. Cette étude analyse les effets de la température sur l'accessibilité de certains de ces points de contact. Le récepteur hAT<sub>1</sub> et deux mutants méthionine, le H256M et le F293M ont été photomarkés à plusieurs températures, dans une plage variant de -15°C à 37°C, avec le <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. Les récepteurs marqués ont été partiellement purifiés et digérés au CNBr pour identifier les régions de contact. Il n'y avait pas de changement dans les patrons de digestion du récepteur natif ni du F293M dans le DTMVII à toute les températures testées. Par contre, des changements en fonction de la température ont été observés chez le mutant H256M. À -15°C, le marquage du H256M était identique à celui du récepteur natif qui indique un marquage du DTMVII. Parallèlement, le photomarquage à 37°C a démontré un marquage presque exclusif sur la méthionine mutée située dans le DTMVI. Le marquage simultané et compétitif des différentes régions du récepteur à 37°C nous indique une structure du complexe ligand-récepteur fluctuante, tandis que le photomarquage à température plus basse démontre une structure plus rigide et compacte.

**Abstract:**

Photoaffinity labelling is regularly used to investigate proteins, including peptidergic G protein-coupled receptors (GPCR). To this purpose benzophenone photolabels have been widely used to identify many contact residues in ligand-binding pockets. The three-dimensional binding environment of the human angiotensin II type 1 receptor hAT<sub>1</sub> has been determined using an iterative methionine mutagenesis strategy based on the photochemical properties and preferential incorporation of benzophenone onto methionine. This has led to the construction of a ligand-bound receptor structure. The present study investigated the effect of temperature on the accessibility of some of these contact points. The hAT<sub>1</sub> receptor and two representative Met mutants (H256M-hAT<sub>1</sub> and F293M-hAT<sub>1</sub>) from the iterative mutagenesis study were photolabelled with the benzophenone-ligand <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII at temperatures ranging from -15°C to 37°C. Labelled receptors were partially purified and digested with cyanogen bromide to identify the contact points or segments. There were no changes in receptor contacts or labelling in the 7th transmembrane domains of hAT<sub>1</sub> and F293M-hAT<sub>1</sub> across the temperature range. However, a temperature-dependent change in the ligand-receptor contact of H256M-hAT<sub>1</sub> was observed. At -15°C, H256M labelling was identical to that of hAT<sub>1</sub>, indicating that the interaction was specific to the 7th transmembrane domain. Significant labelling changes were observed at higher temperatures and at 37°C labelling occurred almost exclusively at mutated residue H256M-hAT<sub>1</sub> in the 6th transmembrane domain. Simultaneous competitive labelling of different areas of this target protein indicated that the ligand-receptor structure became increasingly fluctuating at physiological temperatures, while a more compact, low mobility, and low energy conformation prevailed at low temperatures.

**Keywords:** GPCR, angiotensin II receptor, hAT<sub>1</sub>, photoaffinity labelling, ligand contact points, thermodynamics

## **Introduction:**

Over 50% of all pharmaceuticals target G protein-coupled receptors (GPCRs). GPCRs, like many other membrane proteins, are quite refractory to structural characterization using traditional methods such as nuclear magnetic resonance, electron microscopy, and X-ray crystallography [1-4]. In addition, these methods mainly provide a static picture and thus cannot be used to investigate the microconformational variations within a given protein population that are so crucial to understanding their physiological functions. The need to better understand tertiary structures and the fluctuations inside such proteins is primordial in order to develop a rational approach to designing drugs with the appropriate activities.

Structural analysis by photoaffinity labelling is one of the biochemical methods that has been used for over 40 years to investigate ligand-receptor interactions and the in situ localization of receptors [5-9]. In brief, a biologically relevant ligand containing a photoactivable ligand such as azide, diazirine, or benzophenone is first reversibly bound to its target. Photolysis of the ligand-receptor complex produces a radical intermediate (nitrene, carbene, or keto radical), which forms a covalent bond between the ligand and the receptor [5, 9-12]. In the case of receptors, this method has been applied mainly to peptidergic receptors and their ligands, since binding of the photolabile moiety of a peptide causes only minor structural changes to the ligand, thus assuring native-like ligand binding. If sufficient ligand-receptor contact points can be obtained from such receptor labelling experiments, structural elements can be deduced by applying homology modelling approaches to the structural constraints of experimentally determined contact points [13]. In addition, the preferential binding of benzophenone to methionine has been

exploited to develop the methionine proximity assay (MPA), an iterative Met-mutagenesis strategy that has been applied to the human angiotensin II type 1 receptor (hAT<sub>1</sub>) [14]. Its interaction with angiotensin II (AngII) has been extensively studied in our laboratory [8, 13-16]. A key feature of this interaction is the adoption by the ligand of an extended conformation inside the receptor, with its C-terminal residue in close proximity to the 7th transmembrane domain (TMDVII) [15] as well as TMDIII and TMDVI [14, 17]. The renin-AngII system is one of the key players in physiological blood pressure control and electrolyte balance where the octapeptide AngII (DRVYIHPF) and its cognate receptor hAT<sub>1</sub> are the principal actors. When AngII binds to hAT<sub>1</sub>, a 359-residue GPCR coupled to G<sub>αq/11</sub>, the phospholipase C/inositol phosphate/diacyl glycerol pathways are activated [13, 18].

The three-dimensional environment of the C-terminal amino acid of the AngII ligand in the receptor-binding pocket, of which 11 receptor residues have been identified to date, was determined using the MPA approach. The ligand-contacting residues of the hAT<sub>1</sub> receptor and the retinal contacting residues in bovine rhodopsin are largely homologous, indicating that their ligand-receptor interactions and structures are very similar [14].

Labelling variability had been observed, but may have been caused by temperature variations. Although, in previous studies, photolabelling was performed on ice, little attempt was made to control the temperature [12, 14, 16]. The variability may thus have been due to temperature differences. If so, determining the influence of temperature on photolabelling might provide valuable information on receptor conformations and thermodynamics. The goal of the present study was thus to study temperature-dependant changes of labelling patterns. As such, the experimental

protocol had to be adapted. The heat intensity of the UV sources was lowered, the convective temperature was precisely controlled over the temperature range used in the experiments, and a multi-sampling capacity was added.

The benzophenone-AngII analogue ( $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]AngII) used in both the previous and present studies is a competitive antagonist [15, 19], alternatively also defined as a neutral orthosteric agonist, that has been used to identify the contact point residues L112M and Y113M in TMDIII, H249M, W253M, H256M and T260M in TMDVI, and 293 through 297 in TMDVII [14-16]. We selected the primary receptor contact mutant F293M-hAT<sub>1</sub> for the present temperature-controlled study. F293M-hAT<sub>1</sub> was identified as the primary photoligand attachment point by Edman degradation of the labelled hAT<sub>1</sub> receptor, which was confirmed using the F293M-hAT<sub>1</sub> mutant [15]. A second mutant (H256M-hAT<sub>1</sub> in TMDVI) with easily identifiable protein fragments was also selected [14]. The native (WT) hAT<sub>1</sub> was included as a control. The receptors were labelled with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII at -15°C, 0°C, 15°C, 25°C, and 37°C. The labelled receptors were isolated and CNBr-digested to detect changes in labelling patterns.

**Materials and methods:**

**Materials** - Bovine serum albumin (BSA), bacitracin, soybean trypsin inhibitor, and CNBr were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Acetonitrile and ethylene glycol were from Fisher Scientific (Oakville, ON, Canada). Culture media were from Invitrogen (San Diego, CA, USA). FuGene 6 transfection reagent and Protease Inhibitor Cocktail® were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). X-ray films (Kodak Biomax®MS, Rochester, NY, USA) with intensifying screens from Fischer Scientific were used to visualize CNBr digestion fragments.

**Synthesis and radioiodination of the photoligand** -  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII was prepared according to Bosse et al.[19]. The peptide was iodinated ( $1500 \pm 500$  Ci/mmol) as previously described [14, 20], except that an acetic acid buffer (pH 5.4) was used.

**Cell cultures and transfection of COS-7 cells** - COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% [v/v] foetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and were transfected with plasmids produced during previous studies [14, 15] at ~70% confluence using the FuGene 6 transfection reagent according to the manufacturer's instructions. Thirty-six hours after the initiation of transfection, the cells were washed once with PBS (137 mM NaCl, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.5 mM KCl, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 8.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 3.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) and immediately stored at -80°C until used.

**Photoaffinity labelling** - Frozen transfected COS-7 cells were thawed for 1 min at 37°C. The broken cells were then gently scraped, resuspended in 10 ml of washing buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>), and centrifuged (500 g for 10 min at 4°C). The pellet was dispersed in binding buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% [w/v] BSA). The broken cell suspension (1 mg of protein) was incubated for 60 min at room temperature in the presence of 3 nM <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. After centrifugation at 500 g, the pelleted broken cells were washed once and resuspended in 0.5 ml of ice-cold washing buffer, then irradiated for 60 min in a temperature-controlled photoreaction chamber (± 2°C) in 5 ml Pyrex eppendorf tubes (Fisher Scientific) immersed in cooling solution (equal parts water and ethylene glycol) within the spiral cage of the UV source (13 W Noma® Mini Spiral Black light, λ max 365 nm, serial no. 52-5146-0, Trileaf Distribution, Toronto, ON, Canada). The photoreaction chamber was placed in a temperature-controlled MGW Lauda RC20 Brinkman refrigeration unit equipped with a B. Braun Thermomix II and six UV light sources. The samples were centrifuged (2,500 g for 10 min at 4°C) and the pellet was solubilised for 30 min at 4°C in m-Ripa buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.5% [w/v] deoxycholate, 0.1% [w/v] SDS, and 1% [v/v] Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-Free) from Roche (Laval, QC, Canada). The cell lysate was centrifuged (15,000 g for 25 min at 4°C) to remove insoluble material and the supernatant was stored at -20°C until used.

**Partial purification of the labelled complex** - The solubilised photolabelled receptor complexes were diluted in an equal volume of 2X Laemmli buffer (120 mM Tris-HCl

[pH 6.8], 20% [v/v] glycerol, 4% [w/v] SDS, 200 mM DTT, and 0.05% [w/v] bromophenol blue) and incubated for 60 min at 37°C. SDS-PAGE was performed as previously described [21] using a 10% polyacrylamide preparative gel. The gel was first exposed to an X-ray film with an intensifying screen and was then cut into slices. The radioactive content of the slices was measured using a  $\gamma$ -counter. The labelled receptor was passively eluted from the gel slices into fresh electrophoresis buffer (25 mM Trizma Base [pH 8.3], 250 mM glycine, and 0.1% [w/v] SDS) for 2-3 days at 4°C with gentle agitation as described by Blanton and Cohen [22]. The eluate (~40 ml) was concentrated to a final volume of 100–250  $\mu$ l using an Amicon-10 filter from Millipore (Bedford, MA, USA), lyophilised, and dissolved in water in preparation for CNBr digestion.

**CNBr Digestion** - The partially purified photolabelled receptor (up to 3,500 cpm) was diluted in a 3:5 mixture of 30% trifluoroacetic acid and 50 mg/ml [w/v] of CNBr in 100% acetonitrile. The 100  $\mu$ l samples were incubated at room temperature in the dark for 18–24 h. Water (1 ml) was added to terminate the reaction. The samples were lyophilised and dissolved in Tris-tricine with 1X Laemmli buffer, loaded (3,500 cpm) on 16.5% SDS-PAGE Tris-tricine running gels from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Photolabelled bands were revealed by autoradiography on X-ray films from Kodak Biomax (Rochester, NY, USA).  $^{14}$ C-labeled low molecular weight protein markers from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada) were used to determine apparent molecular weights. Running conditions and staining procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

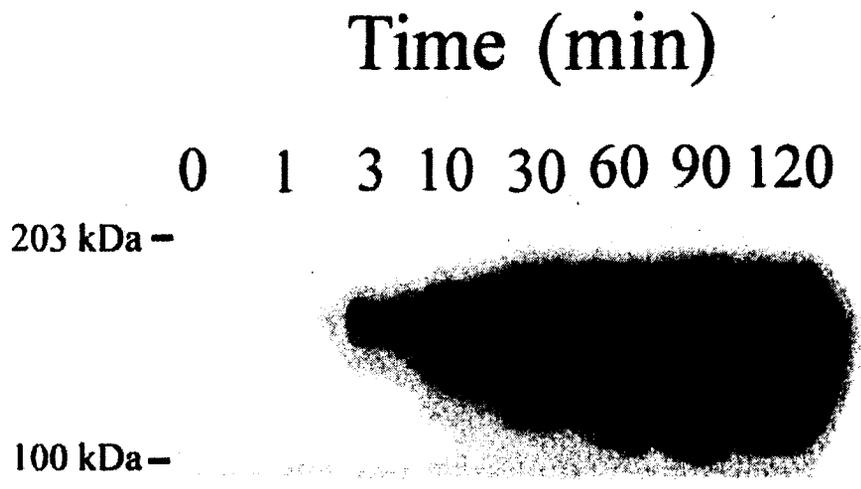
**Results:**

The results are presented as the means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Receptor mutants H256M-hAT<sub>1</sub> and F293M-hAT<sub>1</sub> had been characterised previously [14] and their affinities for <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII, cell expression rates, and AngII-stimulated IP production were comparable to those of the wild-type receptor (WT) [14].

**Photoreaction time course.** To determine the validity of the photolabelling method used here and to compare it to the previous methods, the efficiency of the temperature-controlled photoreaction chamber used in this study was evaluated. The hAT<sub>1</sub> receptor samples were incubated with <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII at 25°C, placed in the photoreaction chamber at the selected temperature, and subjected to photolysis. Tubes were removed from the photoreaction chamber at various times to stop the reaction. The samples were analysed by SDS-PAGE and the bands were visualised by autoradiography. Figure 1 shows that the reaction was complete after 60 min of irradiation, confirming that the photolytic capacity of the set-up used in this study was similar to that of the previous study.

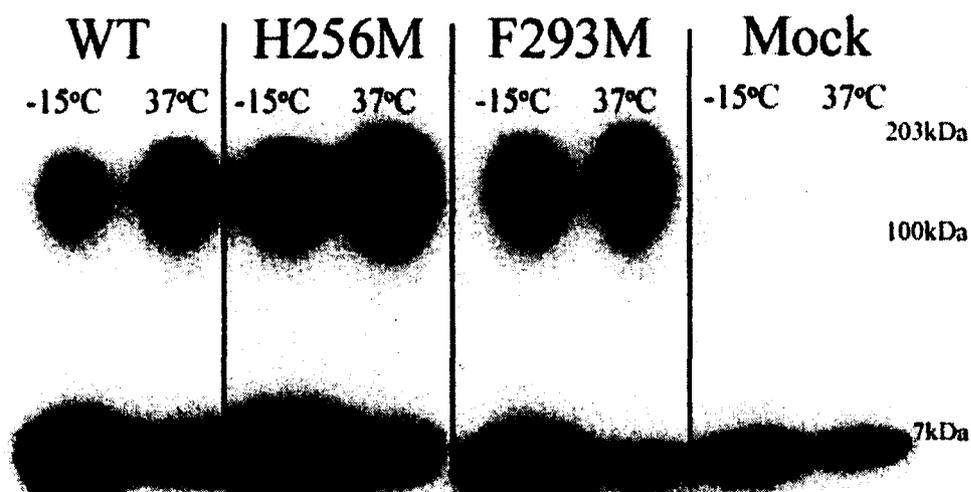
**Temperature effects on photolabelling yields.** The hAT<sub>1</sub> and mutant receptors were incubated with the photoligand for 1h at 25°C to allow a binding equilibrium. The photolabelled receptors were then subjected to photolysis at -15°C or 37°C. Photoaffinity labelling yields with the WT receptor and both mutant receptors were lower at -15°C than at 37°C (Figure 2). Photolabelling at -15°C resulted in a 2- to 3-

**Figure 2.1 :**



**Figure 1:** Time-dependant photoreaction at 25°C. Autoradiography of SDS-PAGE of undigested samples separated on a 10% acrylamide Tris-Glycine gel.

**Figure 2.2 :**



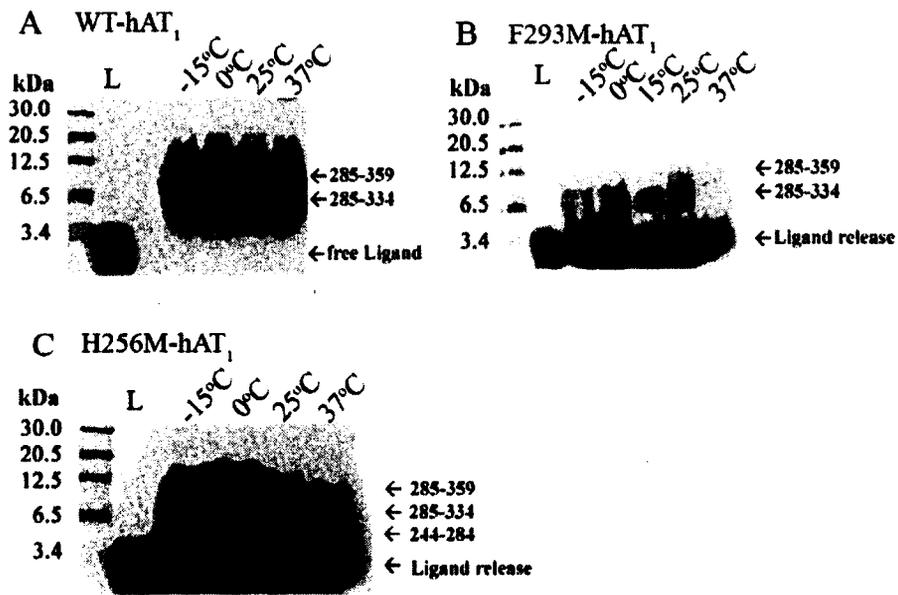
**Figure 2:** Incorporation yields as a function of temperature. Membranes from hAT<sub>1</sub> (WT) and mutant receptor (F293M-hAT<sub>1</sub> and H256M-hAT<sub>1</sub>) expressing cells, as well as mock transfected cells (empty pcDNA3.1 plasmid), were incubated at 25°C for 60 min in the dark with a photolabel ( $16 \pm 5$  nM  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII). Equal portions were photolabelled for 60 min at -15°C or 37°C and then centrifuged. The pellet was resuspended and the fragments were separated by SDS-PAGE on a 10% acrylamide Tris-glycine gel, followed by autoradiography and  $\gamma$ -counting. Labelled receptors migrated between 100 and 203 kDa and unligated  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII migrated below 6.6 kDa.

fold ( $2.2 \pm 0.8$ , expressed as labelling ratios from the  $\gamma$ -counts) lower yield than photolabelling at 37°C. Photolabelling was also specific to the hAT<sub>1</sub> receptor since no photolabelling occurred in non-hAT<sub>1</sub> expressing cells. Previous studies have also shown that  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII labelling is blocked by an excess of AngII [14, 19].

**Photolabelling at different temperatures and determining contact points.**

Photolabelling WT-hAT<sub>1</sub> with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII followed by CNBr digestion gave identical fragments at all the temperatures tested. This result indicated that the interaction, presumably at 293F-hAT<sub>1</sub> and 294N-hAT<sub>1</sub> of TMDVII as has been previously reported [15], did not change (fragment 285-334, Figure 3A). In order to confirm that the interaction with residue 293F-hAT<sub>1</sub> of TMDVII was the same at all the temperatures tested, F293M-hAT<sub>1</sub> was labelled and processed using the same conditions. CNBr digestion of the intact, prepurified ligand-receptor complex (100 to 203 kDa) produced, in addition to small amounts of the fragments mentioned above, a major fragment (<3.4 kDa) that had the same electrophoretic mobility as the free ligand [14, 15]. This CNBr digestion profile indicated that the methionine residue inserted at position 293F-hAT<sub>1</sub> of the receptor was labelled at all the temperatures tested (Figure 3B). Mutant H256M-hAT<sub>1</sub>, on the other hand, had a much different profile. At -15°C, essentially the same fragments as those of the WT receptor (7.2 kDa fragment 285-334 and the partially digested 10.0 kDa fragment 285-359) were labelled, indicating that an interaction identical to that with WT-hAT<sub>1</sub> had occurred with the TMDVII of mutant H256M-hAT<sub>1</sub>. At higher temperatures, however, the labelling of H256M-hAT<sub>1</sub> increasingly shifted to other fragments. At 37°C, CNBr

Figure 2.3 :



**Figure 3:** hAT<sub>1</sub> and mutants photolabelled at different temperatures and digested with CNBr. The CNBr fragments were separated by SDS-PAGE on a 16.5% acrylamide Tris-tricine gel followed by autoradiography. Panel A: WT-hAT<sub>1</sub>; panel B: F293M-hAT<sub>1</sub>; and panel C: H256M-hAT<sub>1</sub>. L = free photoligand <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII.

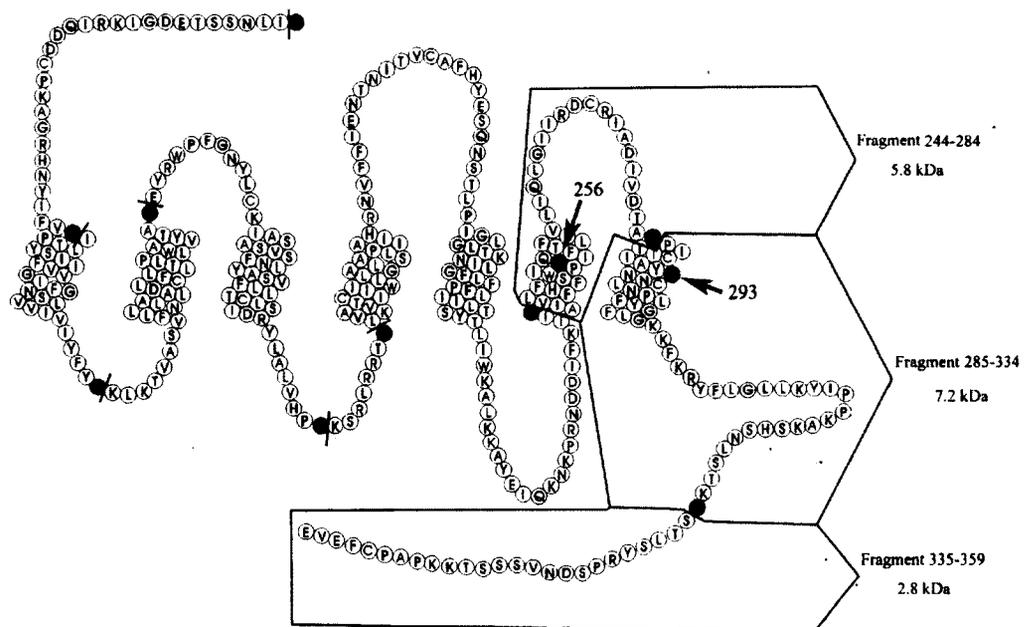
digestion largely produced a single fragment that co-migrated with the free ligand (Figure 3C). This fragment corresponded to CNBr-induced ligand release but, in this mutant, the methionine inserted into TMDVI of H256M-hAT<sub>1</sub> was labelled (Figure 3C). At intermediate temperatures, a mixture of both labelling patterns was observed, with TMDVI-labelling increasing in parallel with temperature. In addition, a 5.8 kDa fragment appeared that was compatible with fragment 244-284 in TMDVI of the third extracellular loop. This fragment may have been a result of partial cleavage of the labelled methionine. Figure 4 is a schematic of the regions quantified in the SDS-PAGE gels.

#### **Discussion:**

Functional proteins of homoeothermic organisms are more active at physiological temperatures. This is due in large part to the fact that chemical reactions and the conformation of structural isoforms are optimal at 37°C. At cold or sub-zero conditions, most physiological processes cease as well as the individual biochemical reactions. However, many studies are carried out at low temperatures in order to investigate the conformations of proteins. Thermodynamic studies have played a pivotal role in understanding the functions of proteins in general [23, 24] and soluble proteins in particular [25], as well as membrane protein interactions [26].

Previous MPA studies on hAT<sub>1</sub> and N111G-hAT<sub>1</sub> at 0°C revealed that these proteins have 11 and 10 contact points, respectively [14, 27]. The contact points must have a certain conformational mobility since they are necessarily outside the strict Van der Waals radius of the photolabile moiety [29]. The present study showed, especially

**Figure 2.4 :**



**Figure 4:** Schematic representation of the possible fragment sizes obtained by CNBr digestion after photo-incorporation of the radioactive ligand into the receptor. The CNBr cleavage sites, the native methionines, and the inserted methionines (H256M-hAT<sub>1</sub> and F293M-hAT<sub>1</sub>) are indicated in black.

with the F293M-hAT<sub>1</sub> mutant, that the contact points and conformations observed at low temperatures were also present at physiological temperatures since photolabelling this mutant produced the same CNBr fragments as the wild-type in addition to methionine labelled ligand release, indicating that accessibility of the photolabelling moiety to the receptor residue F293M-hAT<sub>1</sub> had not changed. However, while photolabelling H256M-hAT<sub>1</sub> at -15°C produced a pattern identical to that of WT-hAT<sub>1</sub>, as the temperature was increased, a progressive shift to labelling of the methionine residue inserted at H256M-hAT<sub>1</sub> on TMDVI was observed. The photogenerated benzophenone radical in Bpa preferentially binds to methionine, with a reaction rate 10<sup>4</sup> times that with alanine [30]. However, to be labelled, the methionine residue must be accessible to the benzophenone radical. From our observations at -15°C, the methionine at position H256M-hAT<sub>1</sub> was not accessible because the labelling took place almost exclusively on the non-Met residues 293F-hAT<sub>1</sub> and 294N-hAT<sub>1</sub> in TMDVII [15]. TMDVI and, in particular residue H256M-hAT<sub>1</sub>, became increasingly accessible with increasing temperature and, at 37°C, labelling occurred almost exclusively on the inserted methionine. This does not mean that this residue becomes the exclusive contact point at physiological temperatures but merely reflects the strong selectivity of the photolabel for methionine. For example, labelling still occurred on TMDVII of WT-hAT<sub>1</sub> and the F293M-hAT<sub>1</sub> mutant at 37°C. This indicates that while residue H256M-hAT<sub>1</sub> became increasingly accessible, the 293F-hAT<sub>1</sub> residue remained constantly accessible. A temperature-induced ligand-receptor dynamic process thus permits translational movements [31] that allow methionine-tagging to occur, favouring the lower activation energy of the labelling reaction. The possibility that the behaviour of the H256M-hAT<sub>1</sub> mutant may be due to

a simple perturbation of the hAT<sub>1</sub> structure through the H to M mutation [28, 32] is unlikely since the pharmacological activities of WT-hAT<sub>1</sub> and the two mutants are highly similar [14].

Photochemical activation of the benzophenone moiety and triplet radical decay rates remained virtually unchanged in the -15°C to 37°C temperature range. The increase in photolabelling yields at higher temperatures was thus more likely a reflection of intra-receptor ligand mobility and increased collision rates leading to appropriate C-H bonds than of an increase in the photochemical activation rate.

In conclusion, our results show that at physiological temperatures a signal transduction protein like hAT<sub>1</sub> GPCR should not be seen as a protein that is confined to a minimum energy conformation but rather as a structure that allows access to several conformational populations that could be required to exert its physiological functions, including ligand binding and G protein-signalling. Since the number of possible intermediate conformations is unknown [25, 33], further studies are required to get a better picture of how hAT<sub>1</sub> functions. MPA studies are currently underway to investigate the potential ligand accessibilities of most residues in the seven TMDs of hAT<sub>1</sub> and other peptidergic receptors as well as their constitutively active mutants (CAM). Comparisons of contact points in WT and CAM receptors may also provide insights into the conformational changes that occur during receptor activation.

**Acknowledgements:** We would like to thank the CIHR and CHSFQ for funding this research and Marie-Reine Lefebvre and Brian Holleran for their help and technical support. M.C. has a studentship from HSFC. R.L. is a career investigator and P.L. is a senior scholar of the Fond le la Recherche en Santé du Québec. E.E. is the recipient of the J.C. Edwards Chair in Cardiovascular Research.

## References:

1. Unwin PN, and R Henderson. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J Mol Biol.* 1975: 94: 425-40.
2. Jastrzebska B, D Fotiadis, GF Jang, RE Stenkamp, A Engel, and K Palczewski. Functional and structural characterization of rhodopsin oligomers. *J Biol Chem.* 2006: 281: 11917-22.
3. Wess J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J.* 1997: 11: 346-54.
4. Matthews EE, M Zoonens, and DM Engelman. Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell.* 2006: 127: 447-50.
5. Ruoho AE, H Kiefer, PE Roeder, and SJ Singer. The mechanism of photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973: 70: 2567-71.
6. Lifter J, CL Hew, M Yoshioka, FF Richards, and WH Konigsberg. Affinity-labeled peptides obtained from the combining region of myeloma protein 460. I. Heavy-chain-labeling patterns using dinitrophenyl azide photoaffinity label. *Biochemistry.* 1974: 13: 3567-71.
7. Battersby MK, JG Richards, and H Mohler. Benzodiazepine receptor: photoaffinity labeling and localization. *Eur J Pharmacol.* 1979: 57: 277-8.
8. Escher E, TM Nguyen, and D Regoli. Photoaffinity labeling of the angiotensin II receptor; pharmacology of the labeling peptides in the dark. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978: 56: 956-62.
9. Hesse L, G Erdmann, T Eschenhagen, and HH Wellhoner. Improved method for autoradiographic localization of beta-adrenoceptors using photoaffinity labelling. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1993: 347: 494-9.
10. Singh A, ER Thornton, and FH Westheimer. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J Biol Chem.* 1962: 237: 3006-8.
11. Dorman G, and GD Prestwich. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry.* 1994: 33: 5661-73.
12. Fillion D, M Deraet, BJ Holleran, and E Escher. Stereospecific synthesis of a carbene-generating angiotensin II analogue for comparative photoaffinity labeling: improved incorporation and absence of methionine selectivity. *J Med Chem.* 2006: 49: 2200-9.
13. Boucard AA, BC Wilkes, SA Laporte, E Escher, G Guillemette, and R Leduc. Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure. *Biochemistry.* 2000: 39: 9662-70.
14. Clement M, SS Martin, ME Beaulieu, C Chamberland, P Lavigne, R Leduc, G Guillemette, and E Escher. Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay. *J Biol Chem.* 2005: 280: 27121-9.
15. Perodin J, M Deraet, M Auger-Messier, AA Boucard, L Rihakova, ME Beaulieu, P Lavigne, JL Parent, G Guillemette, R Leduc, and E Escher. Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor. *Biochemistry.* 2002: 41: 14348-56.
16. Rihakova L, M Deraet, M Auger-Messier, J Perodin, AA Boucard, G Guillemette, R Leduc, P Lavigne, and E Escher. Methionine proximity assay, a novel

- method for exploring peptide ligand-receptor interaction. *J Recept Signal Transduct Res.* 2002; 22: 297-313.
17. Gagnon T, D Fillion, MR Lefebvre, and E Escher. Synthesis of an agonistic, difluoro-azido photolabel of angiotensin II and labeling of the AT1 receptor: transmembrane domains 3, 6, and 7 form the ligand-binding pocket. *J Recept Signal Transduct Res.* 2006; 26: 435-51.
  18. Auger-Messier M, G Arguin, B Chaloux, R Leduc, E Escher, and G Guillemette. Down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cells stably expressing the constitutively active angiotensin II N111G-AT(1) receptor. *Mol Endocrinol.* 2004; 18: 2967-80.
  19. Bosse R, G Servant, LM Zhou, G Boulay, G Guillemette, and E Escher. Sar1-p-benzoylphenylalanine-angiotensin, a new photoaffinity probe for selective labeling of the type 2 angiotensin receptor. *Regul Pept.* 1993; 44: 215-23.
  20. Fraker PJ, and JC Speck, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978; 80: 849-57.
  21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
  22. Blanton MP, and JB Cohen. Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry.* 1994; 33: 2859-72.
  23. Bains G, and E Freire. Calorimetric determination of cooperative interactions in high affinity binding processes. *Anal Biochem.* 1991; 192: 203-6.
  24. Freire E. Structural thermodynamics: prediction of protein stability and protein binding affinities. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303: 181-4.
  25. Xie D, and E Freire. Structure based prediction of protein folding intermediates. *J Mol Biol.* 1994; 242: 62-80.
  26. Freire E, and R Biltonen. Estimation of molecular averages and equilibrium fluctuations in lipid bilayer systems from the excess heat capacity function. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 514: 54-68.
  27. Clement M, C Chamberland, J Perodin, R Leduc, G Guillemette, and E Escher. The active and the inactive form of the hAT1 receptor have an identical ligand-binding environment: an MPA study on a constitutively active angiotensin II receptor mutant. *J Recept Signal Transduct Res.* 2006; 26: 417-33.
  28. Schwartz TW, S Perlman, MM Rosenkilde, and SA Hjorth. How receptor mutagenesis may confirm or confuse receptor classification. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 812: 71-84.
  29. Saviano M, R Improta, E Benedetti, B Carrozzini, GL Cascarano, C Didierjean, C Toniolo, and M Crisma. Benzophenone photophore flexibility and proximity: molecular and crystal-state structure of a Bpa-containing trichogin dodecapeptide analogue. *Chembiochem.* 2004; 5: 541-4.
  30. Marciniak BB, K.; Hug, G. L. Quenching of triplet states of aromatic ketones by sulfur-containing amino acids in solution. Evidence for electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 1993; 97: 11937-11943.
  31. Murphy KP, D Xie, KS Thompson, LM Amzel, and E Freire. Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins.* 1994; 18: 63-7.

32. Munson M, S Balasubramanian, KG Fleming, AD Nagi, R O'Brien, JM Sturtevant, and L Regan. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci.* 1996; 5: 1584-93.
33. Kenakin T. Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18: 416-7.

### **3.1 Article 2 : Avant propos**

Statut de l'article : Accepté le 7 juin 2010

Référence : Arsenault, J., Cabana, J., Clément, M., Fillion, D., Leduc, R., Guillemette, G., Escher, E. et Lavigne, P. "Temperature dependant photolabelling of the human Angiotensin II type 1 receptor reveals insights into the conformational landscape of GPCRs and their Activation mechanism." Accepter dans *Biochemical Pharmacology* le 7 juin 2010, in press, Ms. No. BCP-D-10-00412R1.

Apport: J'ai participé activement à l'élaboration de cette étude en planifiant et fournissant 90% des résultats présentés dans cet article. J'ai écrit le premier jet du manuscrit.

### 3.2 Article soumis 2 : Résumé

Nous présentons une nouvelle méthode de photomarquage par affinité permettant d'étudier le récepteur humain d'angiotensine II de type 1 et de son mutant constitutivement actif le N111G à une multitude de températures en utilisant l'analogue  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII et l'essai de proximité aux méthionines. En introduisant une méthionine par mutagenèse itérative dans le récepteur WT hAT<sub>1</sub> et N111G hAT<sub>1</sub>, nous sommes capables d'identifier les résidus dans la pochette de liaison du complexe en exploitant la sélectivité du Bpa pour des méthionines. Nous pouvons améliorer la caractérisation de cette pochette de liaison en variant la température de photolyse entre -20 à 50°C. Les mutants méthionine et N111G du récepteur hAT<sub>1</sub> ont été photomarkés, digérés par CNBr et leurs fragmentations ont été analysées par comptage de gel direct et par densitométrie des autoradiogrammes. Plusieurs changements importants et significatifs dans les patrons de migration ont été observés en fonction de la température et du niveau d'activité constitutive. Le complexe était de plus en plus flexible avec l'augmentation de la température, c'est-à-dire que le Bpa pouvait atteindre des résidus plus éloignés à température plus élevée. La quantification des fragments de digestion a été convertie à une distance proportionnelle correspondant au niveau de marquage méthionine spécifique et soumise à une modélisation par refondu simulé dans le but d'explorer l'étendue des variations conformationnelles en fonction du niveau d'activité constitutive. Nous pouvons remarquer un éloignement du DTMVI par rapport à la pochette de liaison, tandis que le DTMII et V ont démontré un rapprochement. Le DTMIII a démontré un petit déplacement.

**Abstract:**

We present a photoaffinity labeling study of the human Angiotensin II (AngII) type 1 receptor (hAT<sub>1</sub>) and a constitutively active mutant (CAM) N111G hAT<sub>1</sub> at multiple temperatures using a p-Benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) containing AngII analogue <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII and the Methionine Proximity Approach (MPA). By introducing Met residues, which react selectively with Bpa, by mutagenesis in hAT<sub>1</sub> and its CAM, we were able to identify the position of residues that surround the Bpa moiety in the receptor-ligand complexes. Here we refined this characterization by controlling and varying (from -20 to 50°C) the temperature at which the photolabeling was carried out. The hAT<sub>1</sub> Met mutant, as well as CAM double mutant, photolabeled receptors were digested with CNBr and the fragmentation patterns were quantified by radioactive and densitometric analysis. Many important and significant changes in the fragmentation patterns were observed as function of both the temperature of photolysis and the context of constitutive activation. The ligand-receptor complex was increasingly flexible as temperature was increased, i.e. that the Bpa moiety could more easily label increasingly distant residues. These fragmentation patterns were converted into distance constraints that were included into a simulated annealing protocol in order to explore the extent of these conformational changes. In the context of constitutive activation, the 6th transmembrane domain (TM6) was found to exhibit a relative outward movement while TM2 and 5 were found to move closer to the ligand binding site. TM3 showed a slight displacement.

## 1. Introduction:

The relationship between structures of protein ligand complexes and biological activity is of crucial importance to rational drug design. Amongst highly sought after drug targets are the important family of G protein coupled receptors (GPCR). However the structural characterization of GPCR-ligand complexes still represents an extremely daunting task, even though recent advances in X-ray crystallography have permitted high resolution structures of some of these receptors [1-3]. Besides their transmembrane association, the innate conformational dynamics of GPCRs that allows for the existence of diverse pathways of activation through multiple interactions contributes to the difficulty of their structural characterization [4-9]. Newer theories are taking into account the more dynamic nature of protein-ligand interaction, instead of unique static conformations [4, 9, 10]. Hence, approaches complementary to X-Ray crystallography that allow for the characterization of the dynamic nature of the structures of GPCR are thus necessary to investigate this class of membrane proteins.

The human angiotensin II type 1 receptor (hAT<sub>1</sub>) has been highly scrutinized for many decades. The hormone angiotensin II (AngII) is responsible for the maintenance of vascular tonus, aldosterone secretion and electrolyte homeostasis [11]. The hAT<sub>1</sub> receptor canonically signals through the G<sub>q/11</sub>/phospholypase C/Inositol triphosphate pathway. Further studies have found other interacting G proteins, such as G<sub>i/o</sub> and G<sub>12/13</sub> as well as G protein independent pathways depending on cellular context [12]. This further highlights the conformationally adaptive nature of hAT<sub>1</sub> and GPCRs in general, widening the gap away from the original static “lock and key” mechanism [13].

The hAT<sub>1</sub> receptor is constitutively active once the residue Asn 111 (3.35) is mutated to glycine [14]. This constitutively active mutant (CAM) has given much insight into structural mechanisms of constitutive activity [14-17]. In order to better understand the activation mechanism of hAT<sub>1</sub>, we combined hAT<sub>1</sub> and its CAM as a prototypic pair, in a temperature dependent photoaffinity labeling study to explore the conformational landscape of this peptidergic GPCR. Photoaffinity labeling is a useful tool for structure activity studies as well as for elucidating structural changes occurring upon activation [18-22]. Among the most common photoprobes, p-Benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) is very stable under normal light conditions, it reacts mainly with chemically inert C-H bonds and it has a very high cross-linking efficiency [23]. Using this approach, we found that <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII reacts with residues 293-294 of transmembrane domain 7 in native (WT) hAT<sub>1</sub> receptor [22]. Unfortunately, the use of Bpa-based photoprobes has led to variabilities in yields, of labeling patterns, as well as biased specificity for methionine [24-27]. Nevertheless, the inherent selectivity of Bpa towards methionine has been used as an advantage in finding new ligand contact points [16, 19, 20, 22]. This inherent selectivity led to the elaboration of the methionine proximity assay (MPA) which is an iterative Met mutagenesis strategy on the receptor to explore new ligand contact points arising from inserting a methionine in the ligand binding environment and photolabeling it with a Bpa containing ligand [21]. Using the MPA approach we have further defined the position of residues in the binding site of hAT<sub>1</sub> (WT and CAM).

Furthermore, there are certain advantages of performing photolabeling at controlled temperatures [25, 28, 29]. Conceptually, by controlling and varying the photolabeling temperature one should be able to modulate the conformational

landscape or the extent of conformational fluctuations of hAT<sub>1</sub> both in its WT and CAM background. It is anticipated that the extent of conformational fluctuations will be proportional to the kinetic energy or the temperature of the system and that the accessibility of residues in the binding pocket may, consequently, display a temperature dependency. Such a variation in the accessibility of binding site residues could be a direct indicator of the extent of temperature induced conformational fluctuations and dynamical behavior of the receptor. With this in mind, we have exploited the Met mutants that defined the residues forming the binding site within hAT<sub>1</sub> (WT and CAM) [16, 19, 20] for the C-terminal amino acid of the ligand and photolabeled them using the <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII analogue at various temperatures from -20 to 50°C.

## **2. Materials and Methods:**

**2.1. Materials** - Bovine serum albumin (BSA), bacitracin, diisopropyl ethylamine, soybean trypsin inhibitor, Tris-HCl, acrylamide, deoxycolate acid, dithiothreitol (DTT), tricine, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and CNBr were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Acetonitrile, acetic acid, methylene chloride, methanol, isopropanol, 2-Mercapto-ethanol, trifluoroacetic acid, NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, glycerol, and ethylene glycol were from Fisher Scientific (Oakville, ON, Canada). KCl was from Anachemia (Lachine, Qc, Canada). Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and Sodium dodecyl sulfate (SDS) were from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Iodo-Gen was from Pierce (Rockford, IL, USA). Na<sup>125</sup>I was from Perkin-Elmer

(Waltham, MA, USA). Penicillin/streptomycin supplemented with L-Glutamine and Trypsin were from Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). Cell culture mediums were from Invitrogen (San Diego, CA, USA). FuGene 6 transfection reagent, PNGaseF, Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol (NP-40), glycine, Trisma Base, and Protease Inhibitor Cocktail® were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Ammonium persulfate (APS), bromophenol blue, and tetramethylethylenediamine (TEMED) were from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). X-ray films (Kodak Biomax®MS, Rochester, NY, USA) with intensifying screens were from Fischer Scientific.

**2.2. Synthesis and radioiodination of the photoligand** -  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII was prepared according to Bosse et al. [30]. The peptide was iodinated ( $1500 \pm 500$  Ci/mmol) as previously described [19, 31], except that an acetic acid buffer (pH 5.4) was used.

**2.3. Cell cultures and transfection of COS-7 cells** - COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% [v/v] fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and were transfected with the indicated plasmids [16, 19, 20, 22] at ~70% confluence using the FuGene 6 transfection reagent according to the manufacturer's instructions. Thirty-six hours after the initiation of transfection, the cells were washed once with PBS (137 mM NaCl, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.5 mM KCl, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 8.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 3.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) and immediately stored at -80°C until used.

**2.4. Photoaffinity labeling** - Frozen transfected COS-7 cells were thawed for 1 min at 37°C. The broken cells were then gently scraped, resuspended in 10 ml of washing buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>), and centrifuged (500 g for 10 min at 4°C). The pellet was dispersed in binding buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% [w/v] BSA). The broken cell suspension (1 mg of protein) was incubated for 60 min at room temperature in the presence of 3 nM <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. After centrifugation at 500 g, the pelleted broken cells were washed once and resuspended in 0.5 ml of ice-cold washing buffer prepared for corresponding temperature (pH of 7.4), then irradiated for 60 min in a temperature-controlled photoreaction chamber (± 2°C) in 5 ml Pyrex eppendorf tubes (Fisher Scientific) immersed in cooling solution (equal parts water and ethylene glycol) within the spiral cage of the UV source (13 W Noma® Mini Spiral Black light, λ max 365 nm, serial no. 52-5146-0, Trileaf Distribution, Toronto, ON, Canada). The photoreaction chamber was placed in a temperature-controlled MGW Lauda RC20 Brinkman refrigeration unit equipped with a B. Braun Thermomix II and six UV light sources. The photolabeled samples were centrifuged (2,500 g for 10 min at 4°C) and the pellet was solubilized for 30 min at 4°C in m-Ripa buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.5% [w/v] deoxycholate, 0.1% [w/v] SDS, and 1% [v/v] Nonidet P-40) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-Free) from Roche (Laval, QC, Canada). The cell lysate was centrifuged (15,000 g for 25 min at 4°C) to remove insoluble material and the supernatant was stored at -20°C until used.

**2.5. Partial purification of the labeled complex** - The solubilized photolabeled receptor complexes were diluted in an equal volume of 2X Laemmli buffer (120 mM Tris-HCl [pH 6.8], 20% [v/v] glycerol, 4% [w/v] SDS, 200 mM DTT, and 0.05% [w/v] bromophenol blue) and incubated for 60 min at 37°C. SDS-PAGE was performed as previously described [32] using a 10% polyacrylamide preparative gel. The gel was first exposed to an X-ray film (autoradiogram) with an intensifying screen and the radioactive region was then cut into slices. The labeled receptor was passively eluted from the gel slices into fresh electrophoresis buffer (25 mM Trizma Base [pH 8.3], 250 mM glycine, and 0.1% [w/v] SDS) for 2-3 days at 4°C with gentle agitation as described elsewhere [33]. The eluate (~40 ml) was concentrated to a final volume of 100–250 µl using an Amicon-10 filter from Millipore (Bedford, MA, USA), lyophilized, and dissolved in water in preparation for CNBr digestion.

**2.6. Deglycosylation** – The partially purified photolabeled receptor (up to 10,000 cpm) was dissolved in 45µl of the PNGase F reaction buffer (50mM Tris-Base pH 8.0, 25mM EDTA, 0.5% [w/v] NP-40, 0.1% [w/v] SDS, 1% [v/v] 2-Mercapto-ethanol). Five units of PNGase F were added to each sample and the reaction was carried out at 37°C for 18-24h.

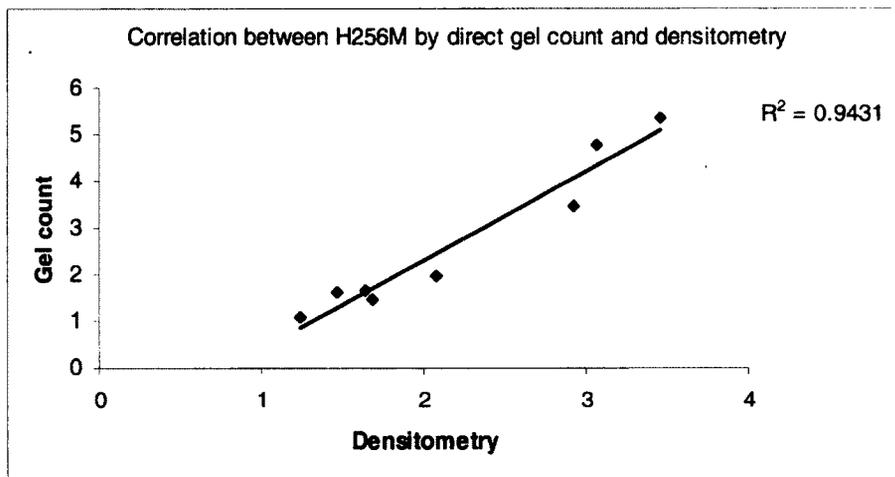
**2.7. CNBr Digestion and migration** - The partially purified photolabeled receptor (up to 3,500 cpm) was diluted in a 3:5 mixture of 30% trifluoroacetic acid and 50 mg/ml [w/v] of CNBr in 100% acetonitrile. The 100 µl samples were incubated at room temperature in the dark for 18–24 h. Water (1 ml) was added to terminate the reaction. The samples were lyophilized and dissolved in Tris-tricine with 1X Laemmli

buffer, loaded (3,500 cpm) on 16.5% SDS-PAGE Tris-tricine running gels from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Photolabeled bands were revealed by autoradiography on X-ray films from Kodak Biomax (Rochester, NY, USA). <sup>14</sup>C-labeled low molecular weight protein markers from Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada) were used to determine apparent molecular weights. Running conditions and staining procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

**2.8. Ratio quantification** - Autoradiograms were scanned as a high resolution .TIFF file. Fragments sizes were quantified by intensity and size using Adobe® photoshop 7.0 (San Jose, CA, USA) using the magnetic lasso and Histogram function. Gels were also sliced according to autoradiogram overlap onto the gel to isolate fragments and quantified by  $\gamma$ -counting in a Wallac 1470 WIZARD™ Gamma Counter (Perkin-Elmer). Direct gel count and densitometric analysis had a correlation of 0.94 (see Figure S1, supplementary data). The accessibility ratios ( $r_{X/TM7}$ ) were obtained from these quantifications which correspond to the integrated radioactive intensities of the Met specific fragments divided by the integrated radioactive intensities of the native fragments, where X designates the location of the mutated Met in hAT<sub>1</sub>. All quantifications were done at least in triplicate and all gel quantification comprise of the average of at least 3 individual variably exposed autoradiograms. Quantified Data was analyzed using Graphpad Prizm 5 (LaJolla, CA, USA).

**2.9. Molecular Modeling** - All calculations were performed using a Silicon Graphics Octane2 workstation (Silicon Graphics Inc., Mountain View, CA, USA).

**Figure 3.S1 :**



**Supplementary figure 1:** Correlation coefficient between the densitometric analysis and the direct gel  $\gamma$  counting of the most fluctuating mutant H256M.

Molecular modeling of the hAT<sub>1</sub> receptor was performed using the INSIGHTII suite of programs (Homology, Discover and Biopolymer; Accelrys, San Diego, CA, USA). The molecular model of hAT<sub>1</sub> (GenBank™ accession no. P30556) was based on the rhodopsin structure (Protein Data Bank: 1U19) [34]. The strictly conserved residues between the hAT<sub>1</sub> receptor and rhodopsin were aligned in order to identify and assign the structurally conserved regions. No gaps were observed inside the TMs. The coordinates of the structurally conserved regions were then transferred to the sequence of hAT<sub>1</sub>. Non-structurally conserved loop regions were constructed using the generate command in the Homology module. This procedure [35] generates loop conformations with minimal potential energies by iteratively sampling the  $\phi$  and  $\psi$  angles. The disulfide bonds between extracellular loops 1 and 2, and between the N-terminal and extracellular loop 3 were then added to hAT<sub>1</sub>. The potential energy of the model was minimized with Discover using the Amber force field [35, 36]. The minimization protocol consisted of three steps. In the first step, the coordinates of all the heavy atoms were fixed. During the second step, only the coordinates of the backbone atoms were fixed. Finally, only the backbone atoms of the TMs were fixed during the final minimization step. The atoms of the N-terminus were left unrestrained throughout the protocol. Distances were calculated using INSIGHTII. Figures were prepared using PyMol v. 0.99rc6 (Shrödinger, NY, USA).

**2.10. Generation of ligand - WT hAT<sub>1</sub> receptor complex model structure** – The [Bpa<sup>8</sup>] AngII ligand was constructed using Builder by adding the Bpa moiety to the position 8 of the AngII NMR structure [37]. The [Bpa<sup>8</sup>] AngII molecule was placed between TM3, 6, and 7 as suggested by previous studies [19, 20] and the present

photolabeling results. It was positioned to accommodate, as much as possible, the restraints (photolabeled Met residues, see below) used for the minimization without interfering with receptor side-chains. The complex between hAT<sub>1</sub> and [Bpa<sup>8</sup>] AngII (with the coulombic terms turned off) was modeled by applying distance restraints between the C $\beta$  atoms of the photolabeled Met residues and the ketone oxygen of Bpa and using a simulated annealing protocol described elsewhere [38]. The usual distance restraint used to accommodate a photolabeling contact point in previous studies [16, 19, 20] was within the range of 7.5 Å between the ketone oxygen of Bpa and the C $\beta$  atoms of the photolabeled Met residues. Since the results here are presented as a ratio ( $r$  or  $r_{X/TM7}$ ) of photolabeling between a Met residue (where X corresponds to the Ballesteros-Weinstein nomenclature) and the residues of TM7 (where TM7 refers to the labeling of either 293 or 294), the distance restraints ( $d$ ) were calculated using the formulas explained in the section 3.6 of the results obtained at 0°C. The non Met residues 293 and 294 which could not be quantified as a  $r_{X/TM7}$  were given 7.5 Å distance constraint in both WT and N111G templates [22].

**2.11. Generation of ligand - CAM hAT<sub>1</sub> receptor complex model structure** – The complex between the [Bpa<sup>8</sup>] AngII ligand and the constitutively active CAM (N111G) mutant receptor was modeled by mutating the N111 residue on the basal model (WT) to a glycine, applying the corresponding distance restraints obtained from the residues'  $r_{X/TM7}$  and using the simulated annealing protocol [38].

### **3. Results:**

#### **3.1. Previously obtained contact points**

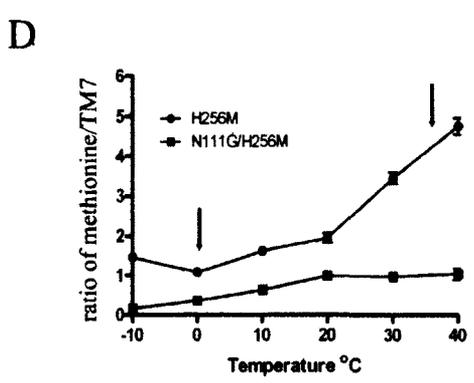
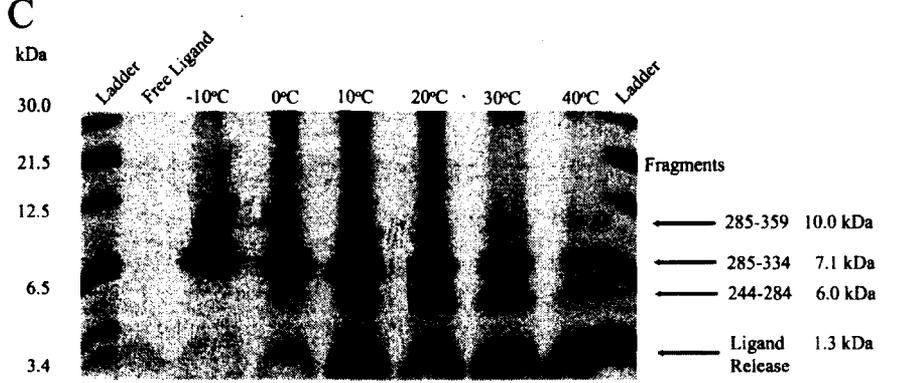
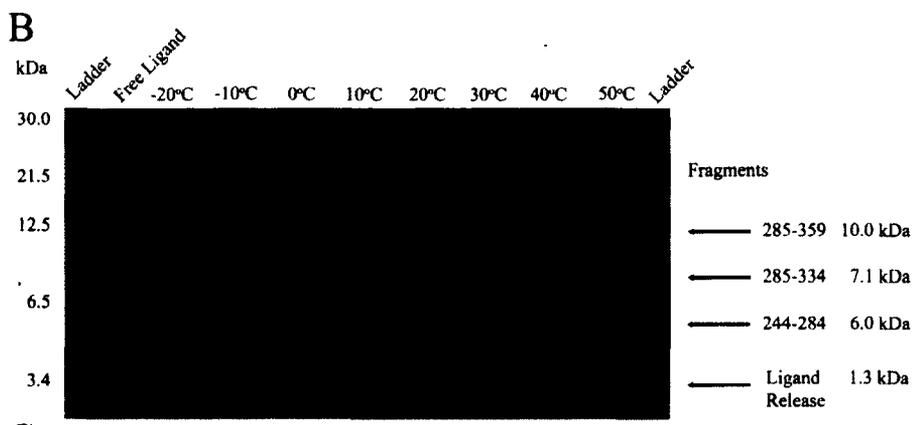
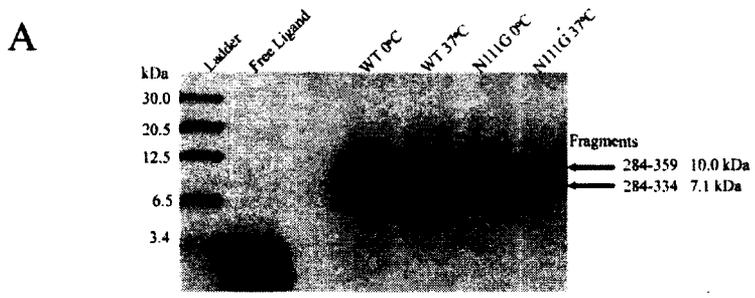
In addition to the labeling of 293 and 294, the MPA approach allowed for the concurrent labeling of Met residues also accessible to the  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII ligand in the hAT<sub>1</sub> binding site. These residues with their corresponding Ballesteros and Weinstein nomenclature [39, 40], are F77M (2.53), L112M (3.36), Y113M (3.37), N200M (5.43), F249M (6.44), W253M (6.48), H256M (6.51), and T260M (6.55) [16, 19, 20]. This concurrent labeling is revisited and quantified below by precisely controlling the temperature of photolysis in both the WT and CAM hAT<sub>1</sub> receptors.

#### **3.2. Photolabeling of WT and CAM hAT1 receptors at different temperatures**

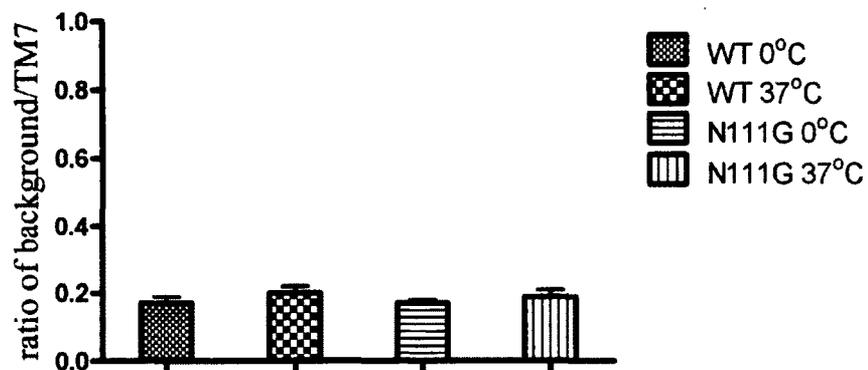
As a reference point, hAT<sub>1</sub> and N111G hAT<sub>1</sub> were photolabeled at 0°C and at 37°C (figure 1A). As previously observed, CNBr digestion of the prepurified receptors yields two characteristic fragments; a 10.0 kDa fragment corresponding to residues 285-359 (8.7 kDa) of TM7 and C-terminal tail in addition to the covalently attached  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) as well as the 7.1 kDa fragment corresponding to residues 285-334 (5.8 kDa) of TM7 in addition to  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa). The 10.0 kDa fragment corresponds to an incomplete digestion at residue 333M [19, 22]. As described elsewhere, the Bpa moiety can attach to residues other than methionine, namely residues F293 and N294 [21, 22]. There is no significant ligand release from CNBr digestion in figure 1A. This means that when no Met residues are engineered in either the WT or the CAM, no endogenous Met side-chains are labeled. In the rest of the text, labeling at residue 293 or 294 will be referred to as TM7 labeling.

**Figure 3.1 :**

**Figure 1:** Temperature dependent photolabeling of hAT<sub>1</sub>. CNBr digestions of prepurified receptors followed by a 16.5% Tris-tricine SDS-PAGE and autoradiogramme. <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] was migrated alone in lane Free Ligand. A: Photolabeling of WT and N111G hAT<sub>1</sub> at 0 and 37°C gave identical fragmentation patterns for both mutants at different temperatures. B and C: Photolabeling of H256M (panel B) and N111G/H256M (panel C) from -20°C to 50°C with <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. D: Quantification of photolabeling regions of H256M and N111G/H256M according to temperature. The signal which corresponds to TM6 labeling was divided by the signal which corresponds to TM7. Results are presented ± S.D. The H256M mutant was significantly more accessible at all temperatures than N111G/H256M (p<0.02, n =3). Supplementary figure 2 shows the quantification of WT and N111G hAT<sub>1</sub> labeling fragments.



**Figure 3.S2 :**



**Supplementary Figure 2:** Quantification of photolabeled regions of WT and N111G hAT<sub>1</sub>. The background signal which migrated inferior to 6.5 kDa was divided by the specific signal of both labeling fragments of 10.0 and 7.1 kDa. Ratios are represented  $\pm$  S.D. n=4.

### 3.3. Photolabeling of H256M and N111G/H256M hAT<sub>1</sub> receptors at different temperatures

In order to assess the extent of the effect of temperature on the labeling of specific methionines, we have photolabeled the H256M hAT<sub>1</sub> (6.51) mutant with the [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII ligand at 10° increments from -20 to 50°C (figure 1B). This mutant has been previously shown to have a temperature dependent shift in labeling patterns [25]. As can be seen there is a stark change in the labeled fragment proportions as a function of temperature. A loss of the 10.0 and 7.1 kDa fragments, representing non-Met labeling in TM7, is observed in favor of fragments at 6.0 and 1.3 kDa, respectively [25]. The new fragments correspond to residues 244 to 284 (4.7 kDa) of TM6 in addition to <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) while the second 1.3 kDa fragment corresponds to the CNBr induced ligand release (<sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII-isothiocyanate). According to previous investigations, the Bpa moiety can covalently bind to either side of the Met-thioether, i.e. to carbon γ or ε on the methionine side-chain [19, 22]. This will affect the CNBr digestions in two ways [19, 21]. Firstly, labeling of Cγ methylene prevents cleavage at this methionine [19, 22] and a new fragment, in this case, the 6.0 kDa fragment is observed. Secondly, if Bpa labels the distal Cε methyl group the CNBr digestion will cleave the peptide bond and the intermediate thiolactone formation will release the isothiocyanate-modified ligand [19, 22]. This fragmentation pattern is only observable if a methionine is labeled.

The appearance of these new CNBr digestion fragments is a resultant of the fact that the Met at position 256 is in close proximity to the Bpa moiety in the <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII-H256M hAT<sub>1</sub> complex. Moreover, the relative intensities of the two labeling patterns provide us with an indication of the relative accessibility of the

Bpa moiety to the methionine relative to TM7 labeling. As discussed in more detail below, these intensities (Methionine specific versus TM7 labeling) can be transformed into distances between the BPA and the mutated methionine and can serve as structural restraints in molecular modeling. Finally, changes in these relative intensities could potentially serve as an indication of a structural change in hAT<sub>1</sub> either as a function of temperature or constitutive activity.

Overall, the data presented in figure 1B, reveals as a function of increasing temperature, that the <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII labels more efficiently the introduced methionine. This suggests that the input of energy into the system is translated into larger fluctuations in the <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII-H256M hAT<sub>1</sub> complex [17, 25].

With the aim to explore the potential effect of the CAM mutation on the digestion pattern observed above, we proceeded to the photolabeling of the N111G/H256M double mutant in function of the temperature of photolysis. The N111G/H256M hAT<sub>1</sub> as well as all the other Met mutants in the N111G background studied here retain constitutive activity (data not shown) indicating that the mutations do not impede the constitutive activation [16, 20]. Furthermore, the <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII has been shown to be a neutral agonist (or weak partial agonist) on the WT and CAM receptors which should not affect the active receptor populations [20]. Non canonical activation pathways [12] for this ligand were not investigated in the previous study [16, 19-22]. Figure 1C shows a temperature dependent shift on N111G/H256M hAT<sub>1</sub>; it is similar to that observed on H256M hAT<sub>1</sub>, but less pronounced. Higher temperatures are necessary to efficiently bring the BPA moiety closer to the methionine in the N111G/H256M hAT<sub>1</sub> receptor compared to the H256M hAT<sub>1</sub> receptor.

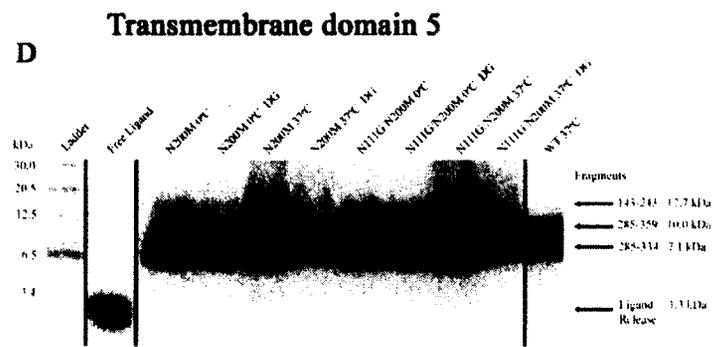
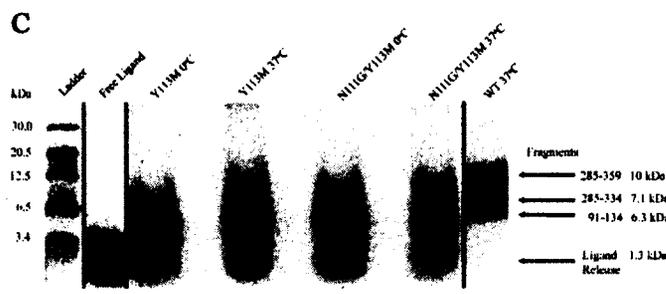
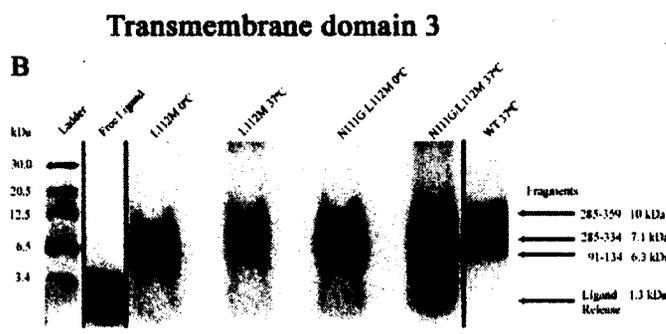
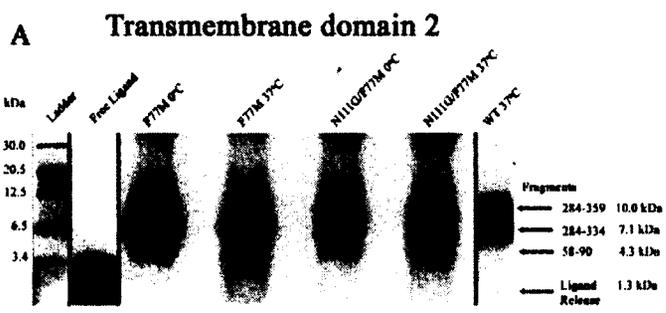
In order to quantify this shift, we have devised a ratio called the labeling accessibility ratio ( $r_{X/TM7}$ ). This ratio is defined as the sum of the radioactivities of the Met specific fragments divided by the sum of the radioactivities of the “native” TM7 fragments, where X designates the position in the hAT<sub>1</sub> receptor where the introduced Met is located (Ballesteros-Weinstein nomenclature). Figure 1D shows the  $r_{6.51/TM7}$  of H256M hAT<sub>1</sub> and N111G/H256M hAT<sub>1</sub> as a function of temperature. At all temperatures, residue 256 had a higher  $r_{6.51/TM7}$  in the WT background than in the CAM background ( $p < 0.02$ ,  $n = 3$ ). However, the accessibility of residue 256 in the CAM background increases less radically as indicated by the lower  $r_{6.51/TM7}$ . This suggests that conformational variations (compared to the WT background) may be caused by the CAM mutation present in the N111G/H256M hAT<sub>1</sub> receptor, which contributes to modulate the  $r_{6.51/TM7}$  at the corresponding temperatures.

### 3.4. Photolabeling of TM2, 3, 5, and 6

As mentioned in section 3.1, TM2 has only one MPA positive residue at position 77 (2.53). Compared to the native labeling, CNBr digestion of the photolabeled TM2 Met mutants yields a new fragment at 4.3 kDa corresponding to the residues 58-90 (3 kDa) plus <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) (see supplementary figure 3A) [19]. Figure 2A shows the  $r_{2.53/TM7}$  ratios of both mutants. The F77M (2.53) mutants displayed a significant increase in photolabeling ratios at 37°C compared to 0°C in the WT and CAM backgrounds ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). There was no significant difference between the WT and CAM mutants regarding to the  $r_{2.53/TM7}$  at a 95% confidence interval.

**Figure 3.S3 :**

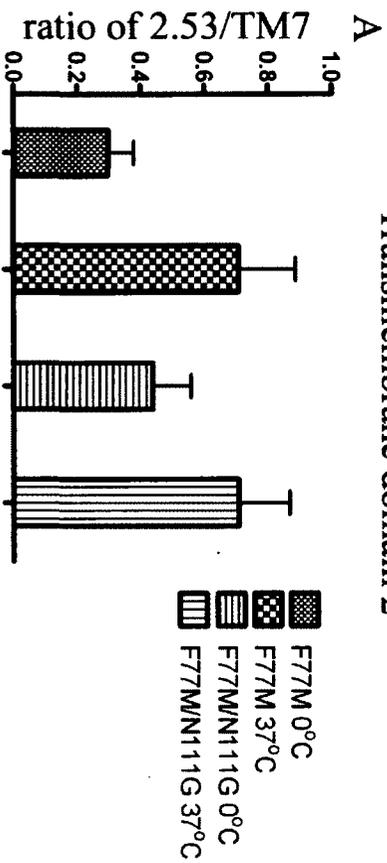
**Supplementary figure 3:** Autoradiogram of the TM2, 3 and 5 mutants. The prepurified photolabeled receptors were digested with CNBr, resolved on 16.5% SDS-PAGE Tris-Tricine gels and exposed to an autoradiogramme.  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] was migrated alone in lane Free Ligand. WT photolabeled at 37°C was added to the figures for comparison. A: Photolabeling of F77M and F77M/N111G hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. B: Photolabeling of L112M and N111G/L112M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. C: Photolabeling of Y113M and N111G/Y113M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. D: Photolabeling of N200M and N111G/N200M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. The prepurified photolabeled receptors with or without deglycosylation (DG) are indicated.



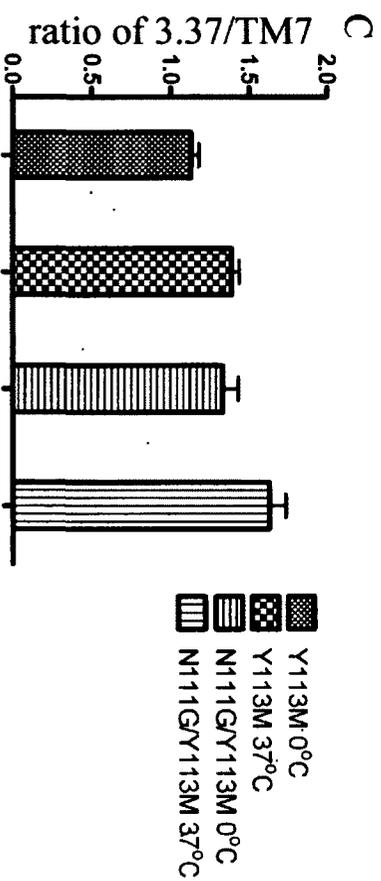
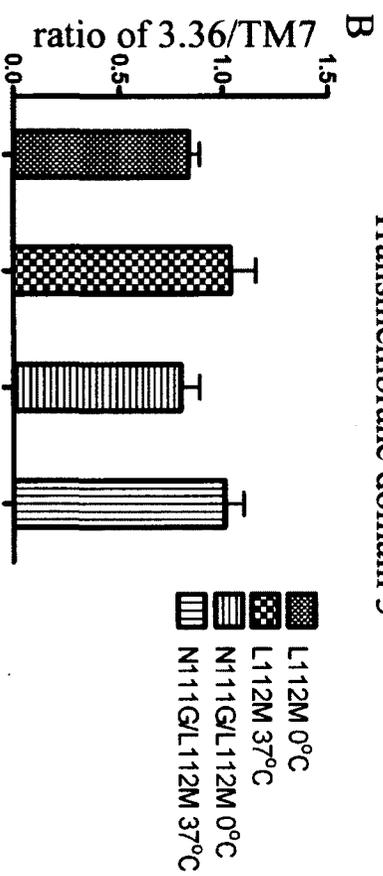
**Figure 3.2 :**

**Figure 2:** Histograms of TM2 and 3. The signal which corresponds to TM2 or 3 was divided by the signal which corresponds to TM7 labeling. Results are presented  $\pm$  S.D. A: Quantification of photolabeling regions of F77M and F77M/N111G hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). B: Quantification of photolabeling regions of L112M and N111G/L112M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ). C: Quantification of photolabeling regions of Y113M and N111G/Y113M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ). This CAM variant was also significantly more accessible than the WT variants at both corresponding temperatures ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ).

Transmembrane domain 2



Transmembrane domain 3



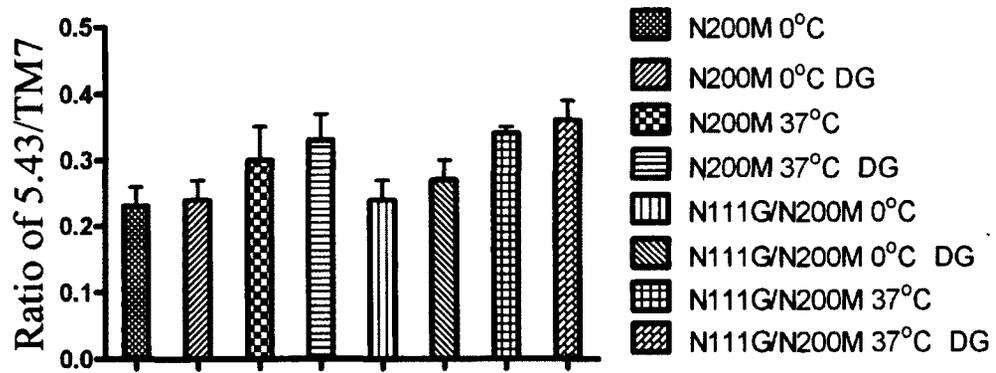
TM3 has two positive MPA residues; L112M (3.36) and Y113M (3.37). As previously determined, CNBr digestion of the photolabeled TM3 Met mutants yields a new fragment at 6.3 kDa which corresponds to residues 91-134 (5.0 kDa) plus  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) (see supplementary figure 3B) [19]. Figure 2B shows the  $r_{3.36/\text{TM}7}$  for both receptor mutants. As observed above, the L112M (3.36) mutants displayed a significant increase in photolabeling ratios at 37°C compared to 0°C in the WT and CAM backgrounds ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ). Again, there was no significant difference in photolabeling ratios. However, photolabeling of the other TM3 mutant, Y113M (3.37) (Supplementary figure 3C) yields the same CNBr digestion patterns as L112M but with a slightly higher labeling accessibility ratio under all test conditions (figure 2C). It showed a significant increase in the  $r_{3.37/\text{TM}7}$  in the constitutively active variant compared to WT background at both temperatures ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ). This mutant also showed a significant increase in the  $r_{3.37/\text{TM}7}$  at 37°C when compared to 0°C in both the WT and the CAM templates ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ).

As stated in section 3.1, TM5 has only one MPA positive position; N200M (5.43). CNBr digestion of the photolabeled Met mutant of TM5 yields a new fragment at 12.7 kDa which corresponds to the non-glycosylated fragment 142-243 (11.4 kDa) plus  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) (see supplementary figure 3D) [16]. The residues 142 to 243 contain 2 N-glycosylation sites. Each of these glycosylations should cause an apparent increase in apparent mass of more than 20 kDa in the SDS-PAGE migrations [41, 42]. However, enzymatic deglycosylation of these mutants did not significantly increase the N200M C $\gamma$  labeling fragment. This suggests that hAT<sub>1</sub> can be deglycosylated under the acidic conditions of CNBr digestion [43].

As seen in figure 3 the  $r_{5.43/TM7}$  showed a significant temperature dependent increase for the CAM mutants only ( $p < 0.01$ ). There was no observable increase in the  $r_{5.43/TM7}$  of the WT versus CAM background.

In addition to H256M (6.51), TM6 has three additional MPA positive positions: 249 (6.44), 253 (6.48), and 260 (6.55). In comparison to the MPA positive positions found in the other TMs, these positions in TM6 showed the largest shift in labeling patterns. CNBr digestion of all the photolabeled TM6 mutants yields a fragment at 6.0 kDa (see above) which corresponds to the fragment 244-284 (4.7 kDa) in addition to  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII (1.3 kDa) (see supplementary figure 4). Figure 4A shows the  $r_{6.44/TM7}$  for this position. Again, the F249M (6.44) mutants displayed a significant increase in photolabeling ratios at 37°C compared to 0°C ( $p < 0.001$ ,  $n=4$ ). There was also a significant decrease in labeling  $r_{6.44/TM7}$  in the CAM background at both temperatures ( $p < 0.001$ ,  $n=4$ ). A similar decrease is observable in the other TM6 mutants. Figure 4B shows the  $r_{6.48/TM7}$  for this position. A more significant decrease in the CAM background ( $p < 0.0001$ ,  $n=4$ ) is observed as well as an increase in the  $r_{6.48/TM7}$  at 37°C compared to 0°C ( $p < 0.005$ ). Similarly, figure 4C shows the  $r_{6.51/TM7}$  for this position. A significant decrease in the  $r_{6.51/TM7}$  of the CAM backgrounds ( $p < 0.005$ ,  $n=4$ ) is observed as well as an important increase in the  $r_{6.51/TM7}$  at 37°C compared to 0°C ( $p < 0.0001$ ). Finally, figure 4D shows the  $r_{6.55/TM7}$  for this position. A significant decrease in the CAM background ( $p < 0.02$ ,  $n=4$ ) is observed as well as an increase in the  $r_{6.55/TM7}$  at 37°C compared to 0°C ( $p < 0.05$ ).

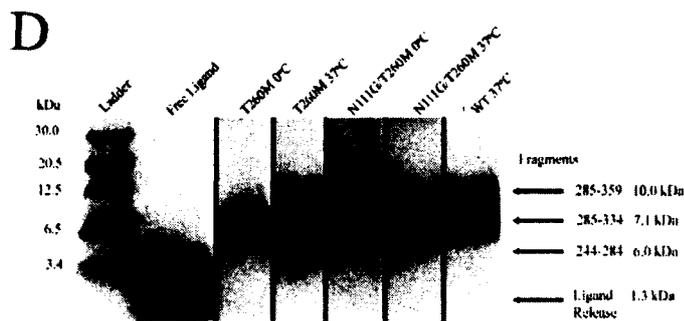
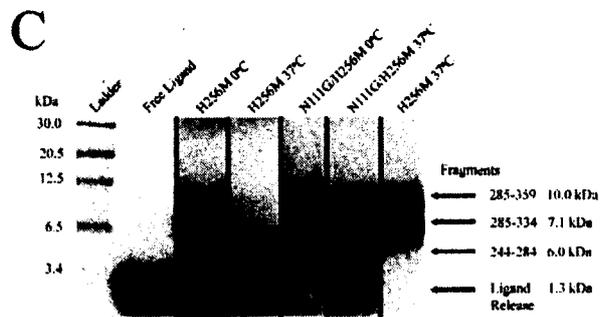
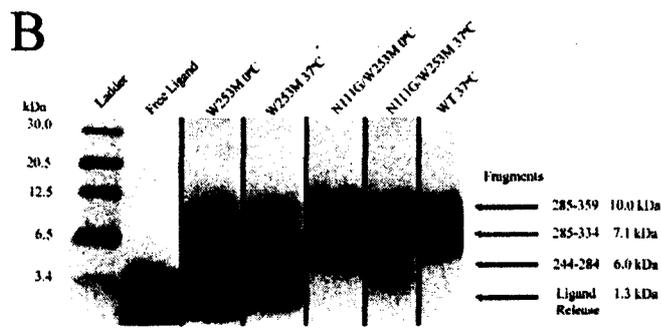
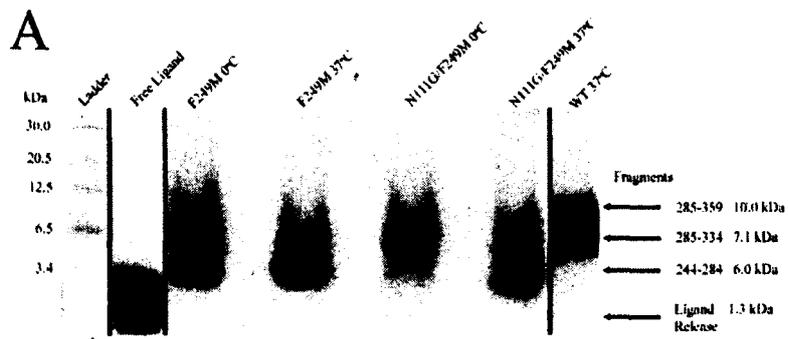
Figure 3.3 :



**Figure 3:** Histogram of TM5. Quantification of photolabeling regions of N200M and N111G/N200M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The signal which corresponds to TM5 was divided by the signal which corresponds to TM7 labeling. Results are presented  $\pm$  S.D. The 37°C photolabeling ratios of N111G/N200M was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ).

**Figure 3.S4 :**

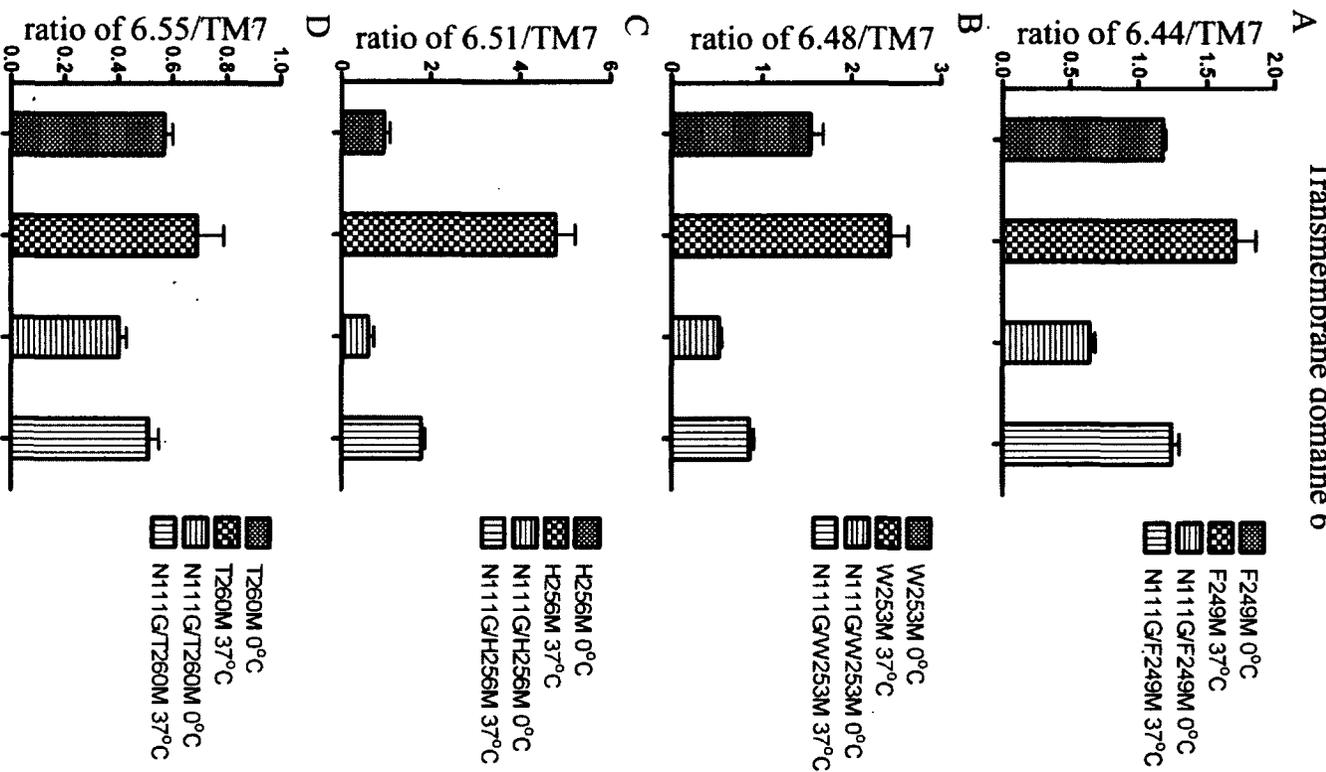
**Supplementary figure 4:** Autoradiogram of TM6 mutants.. The prepurified photolabeled receptors were digested with CNBr, resolved on 16.5% SDS-PAGE Tris-Tricine gels and exposed to an autoradiogramme.  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII was migrated alone in lane Free Ligand. WT photolabeled at 37°C was added to the figures for comparison. A: Photolabeling of F249M and N111G/F249M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. B: Photolabeling of W253M and N111G/W253M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. C: Photolabeling of H256M and N111G/H256M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>]. D: Photolabeling of T260M and N111G/T260M hAT<sub>1</sub> at -0°C to 37°C with  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>].



**Figure 3.4 :**

**Figure 4:** Histograms of TM6. The signal which corresponds to TM6 labeling was divided by the signal which corresponds to TM7. Results are presented  $\pm$  S.D. A: Quantification of photolabeling regions of F249M and N111G/F249M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). The CAM variant was significantly less accessible than the WT variants at both corresponding temperatures ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). B: Quantification of photolabeling regions of W253M and N111G/W253M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.005$ ,  $n = 4$ ). The CAM variant was significantly less accessible than the WT variants at both corresponding temperatures ( $p < 0.0001$ ,  $n = 4$ ). C: Quantification of photolabeling regions of H256M and N111G/H256M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.0001$ ,  $n = 4$ ). The CAM variant was significantly less accessible than the WT variants at both corresponding temperatures ( $p < 0.005$ ,  $n = 4$ ). D: Quantification of photolabeling regions of T260M and N111G/T260M hAT<sub>1</sub> at 0°C and 37°C. The 37°C photolabeling ratios was significantly more accessible than the 0°C photolabeling ratios ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). The CAM variant was significantly less accessible than the WT variants at both corresponding temperatures ( $p < 0.02$ ,  $n = 3$ ).

Transmembrane domain 6



### 3.5. Temperature and activation dependent changes in the $r_{X/TM7}$

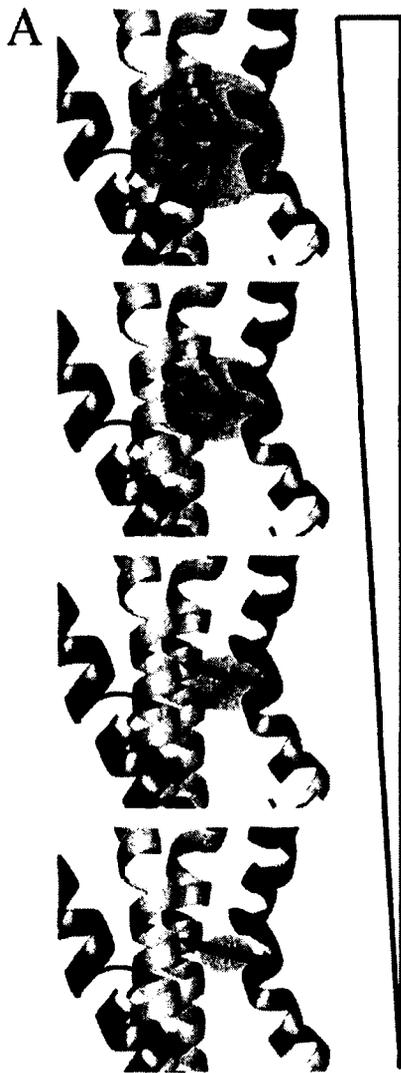
Overall, the data presented above show that in all cases the  $r_{X/TM7}$  increases as a function of temperature irrespective of the background (i.e. WT and CAM). This indicates that the inserted Met side chains become increasingly accessible to the photolabile moiety as temperature rises. This is in complete agreement with increased amplitude of motions within the complex at higher temperature (See figure 5A). On the other hand, the  $r_{X/TM7}$  of all TM6 MPA positive positions decreased in the CAM background. Conversely  $r_{3.37/TM7}$  at position 113 was observed to increase in the CAM background. However, no significant change was observed between the backgrounds for the  $r_{X/TM7}$  of the other mutants. Table 1 summarizes the  $r_{X/TM7}$  of all mutants (see also supplementary Figure 5).

### 3.6. Converting the $r_{X/TM7}$ into distance constraints

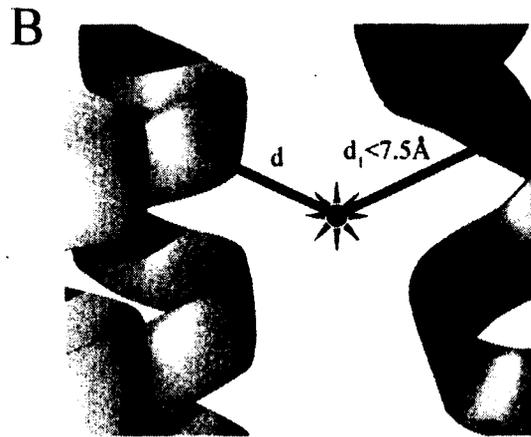
Intuitively, conformational changes between the WT and the CAM complex are underlying these TM specific photolabeling variations. In order to characterize these underlying conformational changes, an empirical method to transform the  $r_{X/TM7}$  into relative distances between the keto group of position 8 in  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII and the two respective labeling loci (one in TM7 and the other on the Met mutated residue) is proposed. A high  $r_{X/TM7}$  indicates that the labeling moiety is closer to the introduced Met than to positions 293 and 294 in TM7 and vice versa. The labeling radius of Bpa was estimated to be within 7.5 Å in a static model [16, 19, 22]. Hence, the maximal distance between two labeling sites could therefore amount up to 15 Å (figure 5B).

**Figure 3.5 :**

**Figure 5:** The range of action of Bpa. Panel A shows a temperature dependent increase in the range of action (blue sphere) of the Bpa moiety (black star) inside the receptor. The higher range in action due to higher temperatures of photolysis, permit the labeling of more distant residues (colored lines) in different TMs. Panel B shows the formula for calculating distances ( $d$ ) inside the receptor. If a given  $d_1$  is up to 7.5 Å ( $d_1 < 7.5 \text{Å}$ ) between the Bpa and the native TM7 residues, high  $r_{X/TM7}$  would translate to a smaller  $d$  and conversely a lower  $r_{X/TM7}$  would translate to a higher  $d$  between the Bpa moiety and the measured residue. Note that extremely high and extremely low  $r_{X/TM7}$  would not be applicable with this formula.



Temperature



$$r = X/TM7$$

$$P_x = \frac{r}{r+1}$$

$$d = (1 - P_x) \times 15 \text{ \AA}$$

$$\therefore \text{if } r = 1 : d = 7.5 \text{ \AA}$$

$$\therefore \text{if } r < 1 : d > 7.5 \text{ \AA}$$

$$\therefore \text{if } r > 1 : d < 7.5 \text{ \AA}$$

**Tableau 3.1 :**

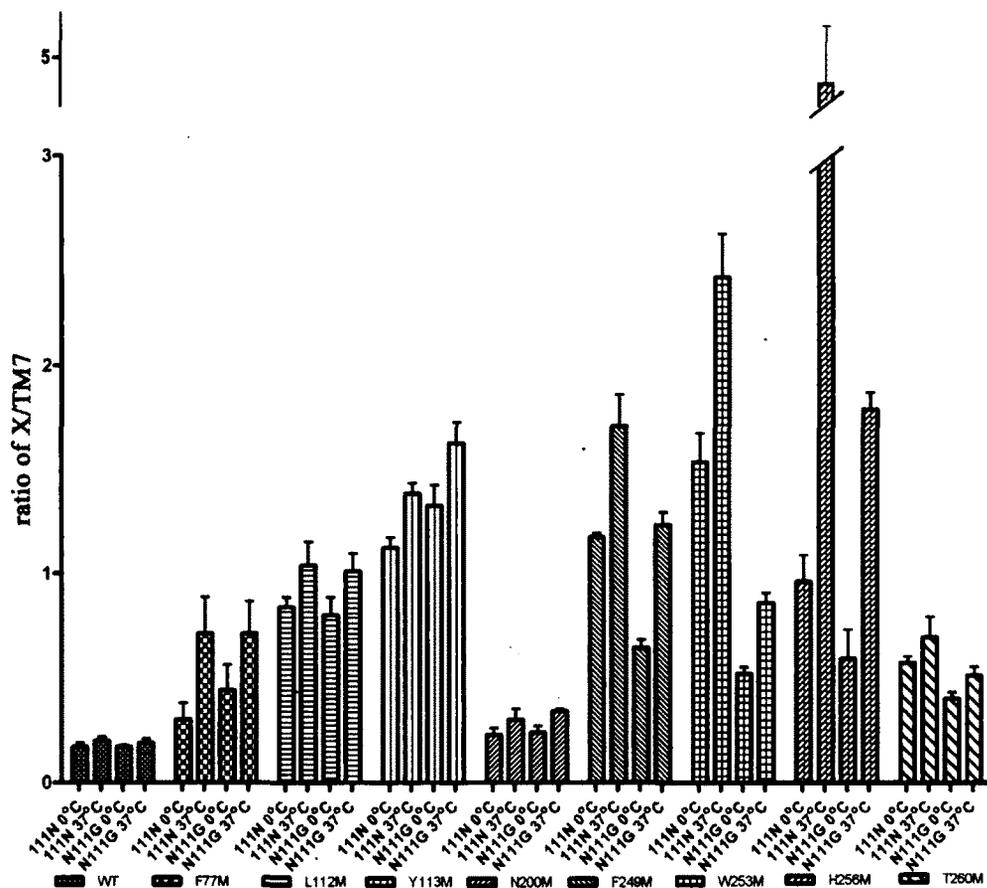
hAT <sub>1</sub> receptor	Ballesteros <sup>1</sup>	$r_{X/TM7}$ 0°C			N	Distance restraint <sup>2</sup> to Bpa (Å)	$r_{X/TM7}$ 37°C		
		Mean	± S.D.				Mean	± S.D.	N
F77M	2.53	0.3	0.08	3	11.6	0.71	0.18	3	
F77M/N111G	2.53/3.35	0.44	0.12	3	10.4	0.71	0.16	3	
L112M	3.36	0.84	0.05	4	8.2	1.04	0.12	4	
N111G/L112M	3.35/3.36	0.8	0.09	4	8.3	1.01	0.09	4	
Y113M	3.37	1.13	0.05	4	7.1	1.39	0.05	4	
N111G/Y113M	3.35/3.37	1.33	0.1	4	6.4	1.63	0.1	4	
N200M	5.43	0.23	0.03	3	12.2	0.3	0.05	3	
N111G/N200M	3.35/5.43	0.24	0.03	3	12.1	0.34	0.01	3	
F249M	6.44	1.18	0.02	4	6.9	1.71	0.15	4	
N111G/F249M	3.35/6.44	0.64	0.04	4	9.1	1.24	0.06	4	
W253M	6.48	1.54	0.14	4	5.9	2.42	0.21	4	
N111G/W253M	3.35/6.48	0.52	0.03	4	9.9	0.86	0.05	4	
H256M	6.51	0.96	0.13	4	7.7	4.8	0.44	4	
N111G/H256M	3.35/6.51	0.59	0.14	4	9.4	1.79	0.08	4	
T260M	6.55	0.57	0.03	4	9.6	0.69	0.1	4	
N111G/T260M	3.35/6.55	0.4	0.03	4	10.7	0.51	0.04	4	

**Table 1:** The methionine/TM7 ratios ( $r_{X/TM7}$ ) at 0°C and 37°C.

<sup>1</sup>All mutants are shown with the Ballesteros and Weinstein nomenclature.

<sup>2</sup>The ratios at 0°C were converted to relative distances (see section 3.6). These were used in a simulated annealing protocol as the relative distance of the Bpa of <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII and mutated Met residue.

Figure 3.S5 :



Supplementary Figure 5: The complete ratios of all tested mutants. All photolabeling ratios of the methionine mutants were significantly higher than WT and N111G respectively ( $p < 0.01$ ).

For example, a ratio of 1 would indicate that there is no observed preference for either site. In this case the mutated Met residue would be given a distance restraint of 7.5 Å from the Bpa. In a case where the ratio is < 1 there is a higher probability for the Bpa to be closer to 293 and 294 in TM7 and the average distance (in terms of a labeled population) from the introduced Met is expected to be larger than 7.5 Å. Inversely, for ratios greater than 1, the average distance from the Met should therefore be smaller than 7.5 Å. In order to estimate such a distance, we define below a function for determining the population of labeled Met mutation ( $P_x$ ) as:

$$P_x = \frac{r}{r+1}$$

where  $r$  is the  $r_{X/TM7}$  measured. Using this functional form and the measured ratios listed in Table 1 at low temperature one can calculate that  $P_x$  is comprised between 0.19 ( $r_{X/TM7} = 0.23$ ) and 0.6 ( $r_{X/TM7} = 1.54$ ). Hence, we propose to use the following equation to estimate the distance of Bpa from the Met of each MPA contact point:

$$d = (1 - P_x) \times 15 \text{Å}$$

Note that these distances represent the approximate position of the Bpa in the most abundantly labeled species and must only be taken as indicative of the most abundant state(s) of the complex. In order to limit the potential degeneration of these states, due to amplified fluctuation in the higher temperature complexes (Methionines become

increasingly labeled at higher temperatures) and optimally exploit the background specific information of the  $r_{X/TM7}$ , we will focus on the relative distances obtained from the 0°C photolabeling in order to characterize potential conformational changes.

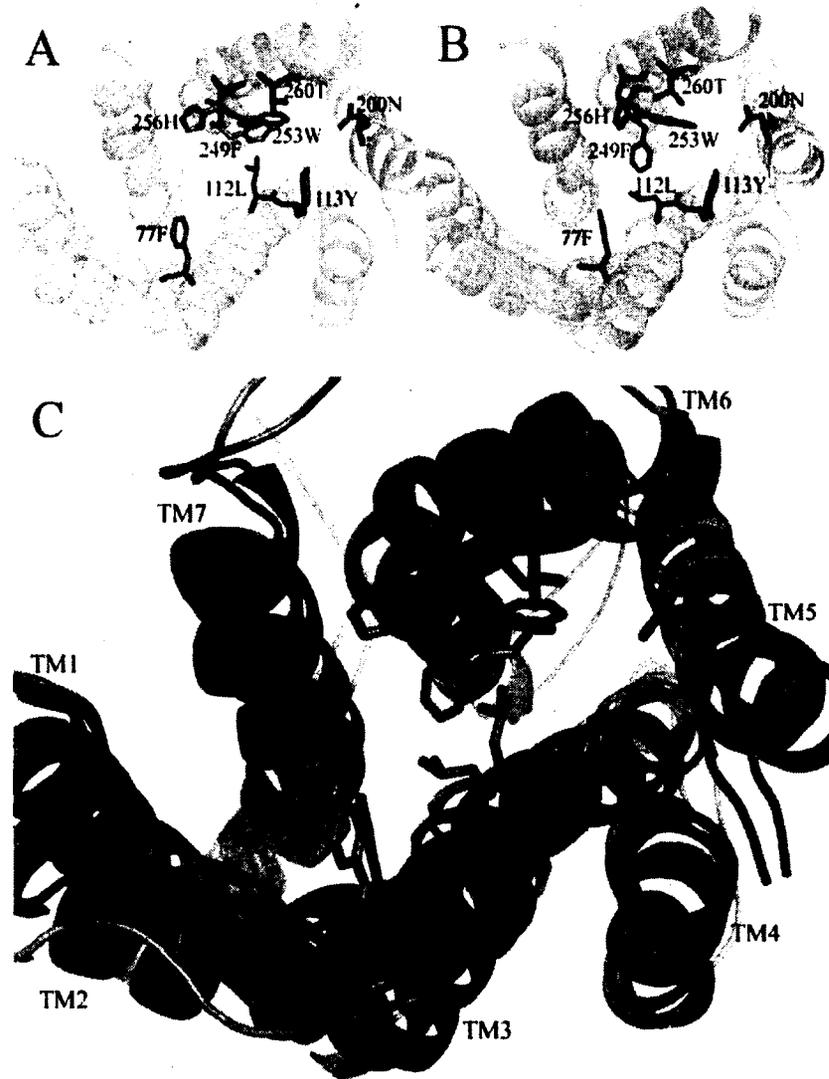
### **3.7. Characterization of the apparent conformational change between the WT and CAM hAT1 by restrained simulated annealing**

In order to evidence the measured conformational change between the WT and the CAM, we have used a simulated annealing approach [38] on homology models of both complexes (see materials and methods). The distances are obtained at low temperature (Table 1) from the  $r_{X/TM7}$  for each residue on both backgrounds and the differences between WT and CAM hAT<sub>1</sub> are shown in figure 6. The left panel displays the model for the WT hAT<sub>1</sub>, the right panel depicts the CAM hAT<sub>1</sub> and the lower panel shows their superposition. An apparent displacement of TM3, an outward movement of TM6, and an inward movement of TM2 and 5 are visible. Analysis of the ligand position in the CAM background reveals a slight shift towards the intracellular side compared to WT hAT<sub>1</sub> (Fig. 7).

## **4. Discussion:**

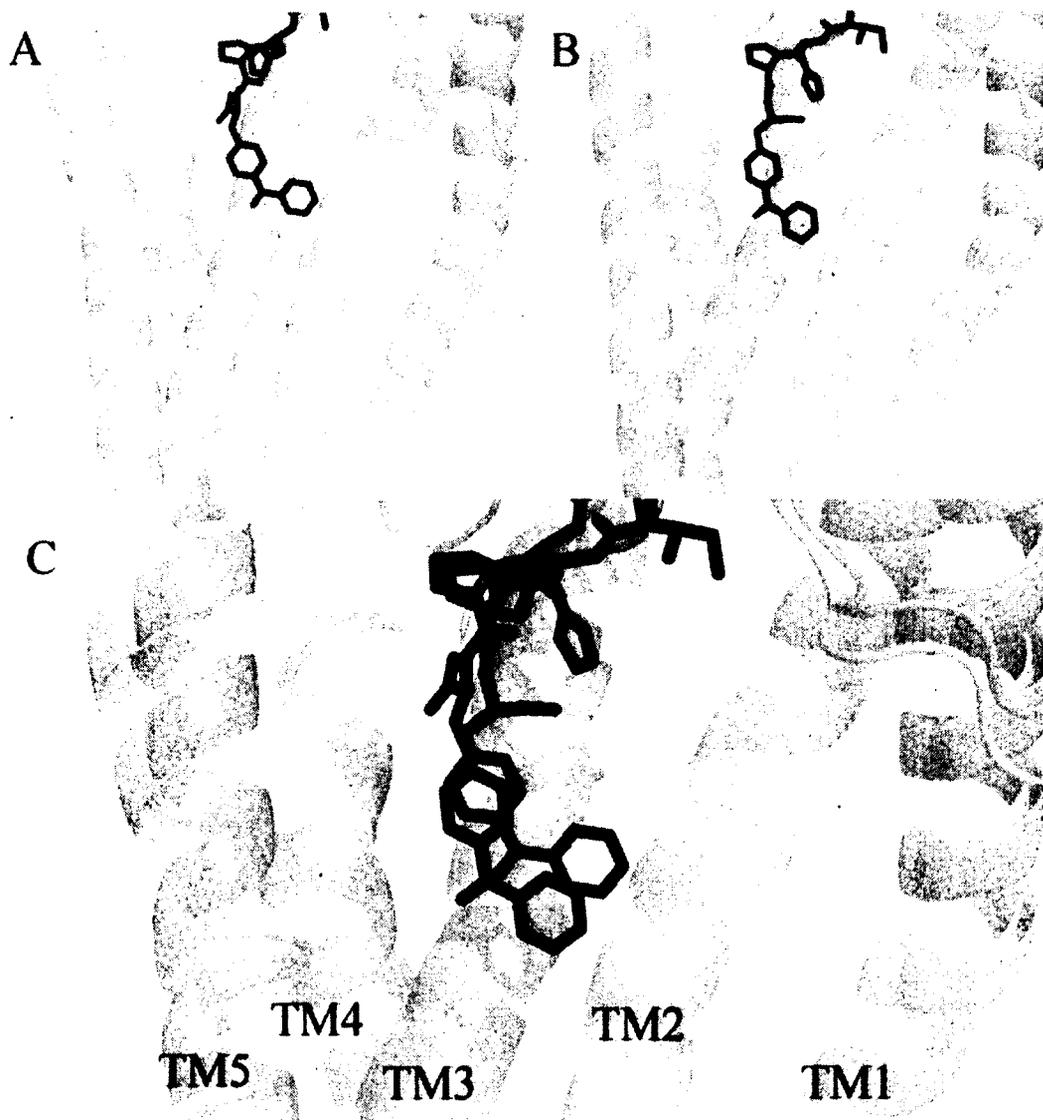
The elucidation of conformational changes between the active and inactive forms of GPCRs has been a daunting task so far. The present contribution applies an extension of the photoaffinity labeling approach to evidence conformational changes in the receptor core that are associated with receptor activation. The extracellular and intracellular domains were therefore not addressed in the present study.

**Figure 3.6 :**



**Figure 6:** Molecular modeling of WT and CAM hAT<sub>1</sub> using the distance constraints indicated in Table 1. The figures are shown from the extracellular perspective without the extracellular loops. A: WT hAT<sub>1</sub> (Green). B: CAM hAT<sub>1</sub> (Blue). C shows the overlap of both conformations. The ligand contact residues and TMs are indicated in black.

**Figure 3.7 :**



**Figure 7:** Molecular modeling of WT and CAM hAT<sub>1</sub> using the distance constraints indicated in table 1. The figures are shown from the membrane perspective through TM6 and 7 (up is the extracellular side and down is the intracellular side). A: WT hAT<sub>1</sub> (Green). B: CAM hAT<sub>1</sub> (Blue). C: the overlap of both conformations.

Intermolecular distances were estimated from relative labeling yields (Fig. 5) and those distances were used in a simulated annealing protocol to generate models for both the WT and the CAM- hAT<sub>1</sub> complexes with a photoligand: <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. Using such an approach, we have been able to unveil differences between the relative orientations of the TMs in the WT and the CAM complexes as depicted in figure 6. Although our results indicate that the N111G hAT<sub>1</sub> mutant can adopt a different conformation than the WT receptor in the presence of <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII, it is impossible, at this stage, to ascertain that the differential labeling in the CAM describes a 100% population of the receptor in a fully active state that couples to G<sub>q11</sub>. Indeed, the labeling could either describe a 100 % population of partially active receptor or a population of less 100% of fully active receptors. However, and as described below, the relative movements of the TMs we unveiled are reminiscent of those reported for the activation of bRho. Moreover, our findings are also supported by results obtained with other biochemical methods on hAT<sub>1</sub> (e.g. SCAM, see below) and its N111G CAM and on other GPCRs in the rhodopsin family. Hence it appears that the movements of the TMs reported here for hAT<sub>1</sub> may prove, in the future, to be somewhat general in the activation mechanism of GPCRs of the rhodopsin family.

The Substituted Cystein Accessibility Method (SCAM) on all TMs of hAT<sub>1</sub> and its CAM was recently completed. The SCAM studies on TM2, which uses the cationic methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA) to interfere with [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII binding, suggests an integral pivot of TM2 towards the binding pocket in the CAM receptor [44]. A similar displacement is also apparent in figure 6. The SCAM study on TM3 suggested a counterclockwise rotation of TM3 in hAT<sub>1</sub> [45]. Here, position 113 (3.37) shows a significant increase in  $r_{3.37/TM7}$  in the CAM template,

which suggests a displacement of this residue towards the ligand binding environment. This translated into a slight movement of TM3 in our CAM complex model (Fig. 6). In accordance with the results of the SCAM study on TM5 [46], a slight movement of this TM towards the binding pocket in the CAM complex model is also noticeable (Fig. 6). Finally, the apparent outward displacement of TM6 (Fig. 6), was suggested by a very significant decrease in the  $r_{X/TM7}$  of 4 contact points in the CAM background; this is also supported by the results of the SCAM study on TM6 [47]. Similarly, in a SCAM study on WT and CAM  $\beta$ 2-adrenergic receptors, TM6 was also shown to move away from TM3 [48].

The best documented case of GPCR activation comes from the structural studies on the opsin family for which numerous crystallographic structures are known. These results indicate that TM6 is moving away from the retinal binding pocket while TM2, 5 and 7 move closer to it upon activation [49, 50]. A slight displacement of TM3 is also reported [49-52]. Our findings on WT and CAM hAT<sub>1</sub> show almost identical displacements. We demonstrate that the ligand binds very closely to residue W253M (6.48) in the WT background and that this interaction is diminished in the CAM background. Residue 6.48 has been shown to be important for agonist activation and it is known as the “toggle switch” in TM6 [48, 50]. In the CAM model the ligand binds deeper inside the transmembrane core which might be necessary for G protein activation (Fig. 7). A similar observation has been reported in the bRho by molecular dynamics simulations which showed a wider retinal binding cleft in a more dynamic and flexible agonist-receptor complex [50]. Since it has been previously shown that position 8 of the AngII analogue <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII interacts with the same environment as retinal in bRho these results further validate our approach and

the ensuing results. Hence, the reported TM rearrangements indicate that hAT<sub>1</sub> and bRho undergo similar conformational changes which was seen in the comparison of bRho with its G protein bound opsin structure [3, 49]. Whether these rearrangements represent a general feature of the activation of GPCRs from the Rhodopsin family remains to be demonstrated by similar studies on other receptors of this class.

Another goal of this study was to evaluate the effect of temperature on the conformational fluctuations of the complexes. We have shown that the  $r_{X/TM7}$  or the methionine specific labeling is favored at higher temperature. This can be interpreted as an increase in the amplitude of temperature induced fluctuations that favor methionine labeling at the expense of “native”, non-Met labeling at positions 293 and 294 in TM7. This leads to an apparently larger reaction radius of Bpa at higher temperatures (Fig. 5). Hence, the use of high temperatures for photolabeling may highlight constraints that are artificially biased by structural fluctuations. The obtained results show that precise temperature control during photolysis and the use of sub-physiological temperatures (e.g. 0-10°C) are important to optimize the resolution of the data obtained from ligand contact points in a given GPCR. However, the use of physiological temperatures during photolabeling permits to explore the range of structurally accessible conformations in a physiologically relevant ligand-receptor interaction. A particular structural state relevant for signal transduction could easily be inaccessible at 0°C where normal signaling activity is mostly absent in homoeothermic organisms.

In conclusion, we have shown that distance restraints obtained from temperature controlled MPA on hAT<sub>1</sub> can be used with a simulated annealing protocol to highlight conformational changes occurring upon receptor activation. This

was exemplified by the comparison of the  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII -WT hAT<sub>1</sub> complex to the  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII -CAM hAT<sub>1</sub> complex. Further photoaffinity labeling studies of hAT<sub>1</sub> and its CAM using other photolabile AngII analogues are currently underway. The presented labeling strategy is generally applicable to any peptidergic GPCR and could permit access to highly pertinent structural and conformational information in absence of complete X-ray or NMR structures.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Marie-Reine Lefebvre and Dr. Brian J. Holleran for their invaluable support and expertise. This research was financed by the CIHR. Emanuel Escher is a recipient of the J.C. Edwards Chair in Cardiovascular Research. Pierre Lavigne is a Chercheur Boursier Sénior of the Fonds en Recherche de la Santé du Québec (FRSQ). Richard Leduc is a Chercheur National of the FRSQ. This article was submitted to fulfill the requirements of a Ph.D. thesis for Jason Arsenault at the Université de Sherbrooke.

## References:

- [1] Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 2007;318:1258-65.
- [2] Day PW, Rasmussen SG, Parnot C, Fung JJ, Masood A, Kobilka TS, et al. A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* 2007;4:927-9.
- [3] Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, et al. Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 2008;455:497-502.
- [4] Cozzini P, Kellogg GE, Spyraakis F, Abraham DJ, Costantino G, Emerson A, et al. Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *J Med Chem* 2008;51:6237-55.
- [5] Kenakin T. Allosteric Theory: Taking Therapeutic Advantage of the Malleable Nature of GPCRs. *Curr Neuropharmacol* 2007;5:149-56.
- [6] Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:382-9.
- [7] May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:1-51.
- [8] Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:45-56.
- [9] Kobilka B, Schertler GF. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:79-83.
- [10] Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:1-13.
- [11] de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:415-72.
- [12] Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006;20:953-70.
- [13] Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 2007;72:1393-401.
- [14] Auger-Messier M, Clement M, Lanctot PM, Leclerc PC, Leduc R, Escher E, et al. The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II maintains a high affinity conformation despite being uncoupled from its cognate G protein Gq/11alpha. *Endocrinology* 2003;144:5277-84.
- [15] Nikiforovich GV, Mihalik B, Catt KJ, Marshall GR. Molecular mechanisms of constitutive activity: mutations at position 111 of the angiotensin AT1 receptor. *J Pept Res* 2005;66:236-48.

- [16] Clement M, Cabana J, Holleran BJ, Leduc R, Guillemette G, Lavigne P, et al. Activation induces structural changes in the liganded angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* 2009;284:26603-12.
- [17] Arsenault J, Renaud MP, Clement M, Fillion D, Guillemette G, Leduc R, et al. Temperature-induced ligand contact point variations of the hAT1 receptor and of the constitutively active mutant N111G-hAT1. *Adv Exp Med Biol* 2009;611:339-40.
- [18] Ruoho AE, Kiefer H, Roeder PE, Singer SJ. The mechanism of photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2567-71.
- [19] Clement M, Martin SS, Beaulieu ME, Chamberland C, Lavigne P, Leduc R, et al. Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay. *J Biol Chem* 2005;280:27121-9.
- [20] Clement M, Chamberland C, Perodin J, Leduc R, Guillemette G, Escher E. The active and the inactive form of the hAT1 receptor have an identical ligand-binding environment: an MPA study on a constitutively active angiotensin II receptor mutant. *J Recept Signal Transduct Res* 2006;26:417-33.
- [21] Rihakova L, Deraet M, Auger-Messier M, Perodin J, Boucard AA, Guillemette G, et al. Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction. *J Recept Signal Transduct Res* 2002;22:297-313.
- [22] Perodin J, Deraet M, Auger-Messier M, Boucard AA, Rihakova L, Beaulieu ME, et al. Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type I receptor. *Biochemistry* 2002;41:14348-56.
- [23] Saviano M, Improta R, Benedetti E, Carrozzini B, Cascarano GL, Didierjean C, et al. Benzophenone photophore flexibility and proximity: molecular and crystal-state structure of a Bpa-containing trichogin dodecapeptide analogue. *Chembiochem* 2004;5:541-4.
- [24] Marciniak BB KH, G. L. Quenching of triplet states of aromatic ketones by sulfur-containing amino acids in solution. Evidence for electron transfer. *J Am Chem Soc* 1993;97:11937-43.
- [25] Arsenault J, Renaud MP, Clement M, Fillion D, Guillemette G, Leduc R, et al. Temperature-dependent variations of ligand-receptor contact points in hAT(1). *J Pept Sci* 2007;13:575-80.
- [26] Wittelsberger A, Thomas BE, Mierke DF, Rosenblatt M. Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments. *FEBS Lett* 2006;580:1872-6.
- [27] Kawamura A, Hindi S, Mihai DM, James L, Aminova O. Binding is not enough: flexibility is needed for photocrosslinking of Lck kinase by benzophenone photoligands. *Bioorg Med Chem* 2008;16:8824-9.
- [28] Souto ML, Borhan B, Nakanishi K. Low-temperature photoaffinity labeling of rhodopsin and intermediates along transduction path. *Methods Enzymol* 2000;316:425-35.
- [29] Dong M, Miller LJ. Effects of pH and temperature on photoaffinity labeling of Family B G protein-coupled receptors. *Regul Pept* 2009.
- [30] Bosse R, Servant G, Zhou LM, Boulay G, Guillemette G, Escher E. Sar1-p-benzoylphenylalanine-angiotensin, a new photoaffinity probe for selective labeling of the type 2 angiotensin receptor. *Regul Pept* 1993;44:215-23.

- [31] Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-57.
- [32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [33] Blanton MP, Cohen JB. Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* 1994;33:2859-72.
- [34] Okada T, Sugihara M, Bondar AN, Elstner M, Entel P, Buss V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* 2004;342:571-83.
- [35] Shenkin PS, Yarmush DL, Fine RM, Wang HJ, Levinthal C. Predicting antibody hypervariable loop conformation. I. Ensembles of random conformations for ringlike structures. *Biopolymers* 1987;26:2053-85.
- [36] Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules (vol 117, pg 5179, 1995). *Journal of the American Chemical Society* 1996;118:2309-.
- [37] Spyroulias GA, Nikolakopoulou P, Tzacos A, Gerothanassis IP, Magafa V, Manessi-Zoupa E, et al. Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. Implication for structure-function relationship. *Eur J Biochem* 2003;270:2163-73.
- [38] Charest G, Lavigne P. Simple and versatile restraints for the accurate modeling of alpha-helical coiled-coil structures of multiple strandedness, orientation and composition. *Biopolymers* 2006;81:202-14.
- [39] Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein coupled receptors. *Meth Neurosci* 1995;25:366-428.
- [40] Ballesteros JA, Shi L, Javitch JA. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:1-19.
- [41] Lanctot PM, Leclerc PC, Clement M, Auger-Messier M, Escher E, Leduc R, et al. Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem J* 2005;390:367-76.
- [42] Lanctot PM, Leclerc PC, Escher E, Leduc R, Guillemette G. Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry* 1999;38:8621-7.
- [43] Donald AS. Partial deglycosylation of blood-group-specific glycoproteins. *Biochem J* 1980;185:327-37.
- [44] Domazet I, Holleran BJ, Martin SS, Lavigne P, Leduc R, Escher E, et al. The second transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor participates in the formation of the ligand binding pocket and undergoes integral pivoting movement during the process of receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284:11922-9.
- [45] Martin SS, Boucard AA, Clement M, Escher E, Leduc R, Guillemette G. Analysis of the third transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor by cysteine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 2004;279:51415-23.

- [46] Domazet I, Martin SS, Holleran BJ, Morin ME, Lacasse P, Lavigne P, et al. The fifth transmembrane domain of angiotensin II Type 1 receptor participates in the formation of the ligand-binding pocket and undergoes a counterclockwise rotation upon receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284:31953-61.
- [47] Martin SS, Holleran BJ, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method. *Mol Pharmacol* 2007;72:182-90.
- [48] Shi L, Liapakis G, Xu R, Guarnieri F, Ballesteros JA, Javitch JA. Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem* 2002;277:40989-96.
- [49] Ahuja S, Smith SO. Multiple switches in G protein-coupled receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:494-502.
- [50] Bhattacharya S, Hall SE, Vaidehi N. Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* 2008;382:539-55.
- [51] Salom D, Lodowski DT, Stenkamp RE, Le Trong I, Golczak M, Jastrzebska B, et al. Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:16123-8.
- [52] Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 2008;454:183-7.

## 4 Annexe 1

Cette section comprend en partie une analyse des mutants N111W. Ce mutant constitutivement inactif a été comparé avec le WT et le N111G hAT<sub>1</sub> en incluant une double mutation à la méthionine au récepteur N111W. La prémisse est que ce modèle nous donnerait de l'information sur un récepteur encore moins actif que le WT. Nous avons construit ces doubles mutants et avons vérifié leur affinité et leur expression. Le double mutant N111W/H256M a été photomarké et comparé au N111G/H256M et au H256M hAT<sub>1</sub>. Les doubles mutants (N111W) étaient peu exprimés et ont perdu beaucoup d'affinité pour le <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII. De plus, le mutant N111W/H256M n'était pas significativement différent du H256M, le mutant démontrant le plus de changement dans les régions de photomarkage en fonction de la température.

Cette section comprend aussi d'autres contrôles tels que le pH et le rendement de digestion au CNBr. La plage de pH testé n'était pas grande : seulement entre pH 6,8 à 7,9 mais ceci devrait plutôt refléter la reproductibilité des expériences. D'une expérience à l'autre, le tampon ne devrait pas sortir de cette plage de valeurs. L'objectif n'étant pas vérifier la contribution du pH, mais simplement de l'éliminer comme facteur influant lors de cette étude. Le mutant L112M fut utilisé dans ces expériences, car il a un bon rendement de photomarkage.

La digestion par CNBr est un facteur pouvant aussi influer la quantification des bandes. Sans utiliser des conditions extrêmes, nous avons utilisé différentes conditions de digestion dans nos expériences. Le but n'était pas de vérifier la contribution du CNBr dans nos expériences, mais simplement d'exclure ce facteur

d'erreur en assurant sa reproductibilité dans la quantification des bandes. Donc, l'étendue des conditions testées est au-delà des bornes de la reproductibilité d'une expérience à l'autre. Le mutant N111G/W253M a donc été utilisé, car il possède un très bon rendement de marquage.

Nous avons aussi analysé la distribution en longueurs d'onde des nouvelles lampes utilisées dans cette méthodologie et nous les avons comparées avec les vieilles lampes pour voir si les spectres d'émissions étaient semblables.

De plus, un test de production d'inositol phosphate a été accompli à 4°C et a été comparé à 37°C dans les mêmes conditions. Le système était encore fonctionnel à 4°C, mais l'amplitude du signal était grandement diminuée.

Nous avons aussi vérifié la contribution du marquage du carbone  $\gamma$  versus le marquage du carbone  $\epsilon$ . Pour ce faire, les mêmes approches de quantifications ont été utilisées pour faire un rapport  $\epsilon/\gamma$ .

#### **4.1 Matériel et méthodes**

La bacitracine a été obtenue de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Tous les autres composés furent décrits dans les sections 2.3 et/ou 3.3. Le spectrophotomètre utilisé pour analyser les longueurs d'onde était le modèle CM 1/4M Digikröm.

**Mutagenèse :** Les doubles mutants N111W/X →Met ont été créés à partir de plasmide pcDNA3.1 contenant préalablement le mutant méthionine en question en utilisant le Quickchange XII mutagenesis kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). En suivant les protocoles du manufacturier, les oligonucléotides suivants ont été insérés : le sens 5' GCCAGCGTCAGTTTCTGGCTGTACGCTAGTG 3' et l'antisens 5' CACTAGCGTACAGCCAGAACTGACGCTGGC 3'. Pour le double mutant N111W/L112M les oligonucléotides suivants ont été utilisés : le sens 5' GTCAGTTTCTGGATGTACGCTAGTTTTCTACTC 3' et l'antisens 5' GAGTAGAAAAGTACGCGTACATCCAGAACTGAC 3'. Pour le double mutant N111W/Y113M les oligonucléotides suivants ont été utilisés : le sens 5' GTCAGTTTCTGGCTGATGGCTGAGTTTTCTACTC 3' et l'antisens 5'GAGTAGAAAAGTACCCATCAGCCAGAACTGAC 3'. Les oligonucléotides ont été obtenus d'Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Les plasmides ont été séquencés par le DNA Core Service à l'université de Calgary avec l'oligo T7 pour la séquence sens et l'oligo SP6 pour la séquence antisens. Les séquences ont été validées par Multalign sur le site (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) en l'alignant avec notre séquence du récepteur WT hAT<sub>1</sub> cloné.

**Saturation :** Les pétris contenant les cellules qui étaient maintenues à -80°C furent cryofracturés à 37°C pour une min. Les cellules ont été grattées soigneusement dans un tampon de lavage [25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl et 5 mM MgCl<sub>2</sub>]. Le surnageant a été centrifugé à 2500g pour 15 min à 4°C. Le culot résultant a été suspendu dans un tampon de liaison [25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) BSA et 0,01% (w/v) bacitracine]. Les cellules suspendues

ont été incubées pour 1 h à température de la pièce dans un volume final de 0,5 mL avec des concentrations croissantes de [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII et de <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII. Le signal de liaison non spécifique fut mesuré en présence de 1 μM de [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII. Le signal radioactif correspondant au ligand lié fut filtré sous vide à travers les membranes 691 glass microfiber filters (VWR International, West Chester, PA, USA) préincubées pour 30 min dans le tampon de liaison. La radioactivité liée fut mesurée sur compteur γ. Les affinités (K<sub>d</sub>) ainsi que l'expression (B<sub>max</sub>) ont été obtenues à partir d'analyses de Scatchard en utilisant GraphPad prism 5<sup>®</sup>. Les expériences ont été faites au minimum en triplicata et correspondent à la moyenne de deux lectures. Les résultats sont présentés avec ± 1 écart type.

Photomarquage et digestion au CNBr : Procédure identique à celle décrite dans la section 3.3. Pour vérifier la contribution du pH, une solution fut préparée à 25°C, refroidie ou réchauffée pour les variations de pH indiquées et comparées à une solution dont le pH a été ajusté à 7.4 à 0 ou à 37°C respectivement. Une concentration finale de 50mg/ml (1X) de CNBr fut utilisée pour les tests de cinétique et 100mg/ml finale pour la double concentration (2X).

Production d'inositols triphosphate: Les cellules (300 000 par puits) ont étéensemencées dans une plaque à 6 puits dans du DMEM 24 h avant la transfection. Les récepteurs hAT<sub>1</sub> pcDNA3.1 et N111G hAT<sub>1</sub> pcDNA3.1 et le plasmide vide pcDNA3.1 ont été transfectés avec du FuGENE 6 comme décrits dans la section 2.3 et 3.3. Les cellules ont été incubées à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub> pendant 18 h. Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS. Le milieu a été remplacé par le milieu M199

contenant 1 % (v/v) myo-[1,2-3H (N)]-inositol et les cellules ont été incubées pour un autre 24 h. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS supplémenté [137 mM NaCl, 0,9 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM KCl, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 8,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 3,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 7,4)] et incubé à 37°C ou à 4°C dans le milieu de stimulation [DMEM contenant 25 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM LiCl et 0,1% (w/v) BSA]] pour 30 min. Ils ont été stimulés avec 100nM d'AngII pour 10 min. Les stimulations ont été arrêtées avec l'addition d'acide perchlorique [5 % (v/v)]. Les IPs hydrosolubles ont été extraits en utilisant un mélange 1:1 de 1,1,2-trichlorotrifluoroethane et tris-*n*-octylamine. Les échantillons ont été mélangés vigoureusement et centrifugés à 15 000 g pour 30 min. La phase supérieure fut éluée sur une colonne de résine AG 1-X8 et les IPs ont été séquentiellement séparés avec l'addition de 0,1 M d'ammonium formate/acide formique avec une force ionique croissante (1:10 à 4:1). La radioactivité des solutions éluées et des culots liposolubles ont été mesurés par compteur  $\gamma$ . La valeur de radioactivité en cpm fut normalisée pour le culot seulement. Chaque expérience fut faite en triplicata et chaque point correspond à la lecture de trois mesures et les résultats sont présentés à  $\pm 1$  écart type.

Analyse des longueurs d'onde d'émission des lampes UV : Les appareils de photolyses ont été placés devant l'ouverture du spectrophotomètre CM 1/4M Digikröm et allumés. Les 1145 lectures obtenues de 194.6 à 608.5 nM pour chaque lampe ont été insérées dans Graphpad prism 5. Les valeurs maximales ont été normalisées à 100 %.

## 4.2 Résultats

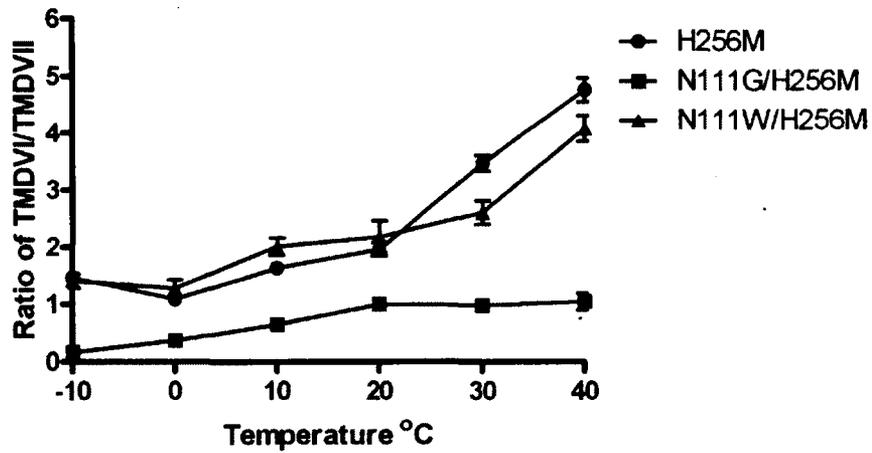
Tous les récepteurs doubles mutants N111W ont été produits et caractérisés sauf pour le F77M/N111W. Les séquences ont été confirmées et les études de saturations ont démontré une grande perte d'expression et d'affinité pour les mutants N111W/L112M, N111W/Y113M, N111W/F249M et N111W/T260M. Ces expressions et affinités faibles ne permettraient pas l'application efficace de photomarquage par affinité. Les autres mutants testés N111W/N200M, N111W/W253M et N111W/H256M ont démontré une affinité et une expression semblable au WT hAT<sub>1</sub>. Le tableau 4.1 démontre les résultats de liaison par saturation.

Le mutant N111G et WT démontrant le plus de changement dans les régions de photomarquage en fonction de la température, le H256M a aussi été photomarké avec sa double mutation N111W à plusieurs températures. La figure 4.1 démontre la comparaison entre le récepteur H256M, le N111G/H256M et le N111W/H256M hAT<sub>1</sub>. Le double mutant N111W/H256M n'a pas démontré de variations significatives des régions de photomarquage en fonction de la température comparée au H256M. Ce résultat nous permet de conclure que les résultats entre le WT et le N111W en termes de photomarquage en fonction de la température sont très semblables ou qu'ils ont des différences hors des limites de détection de notre appareillage. De plus, la perte d'expressions et d'affinités des 4 mutants mentionnés ci-haut ne permettrait pas une analyse complète des 8 points de contact obtenus dans le modèle WT et N111G.

Récepteur hAT <sub>1</sub>	K <sub>d</sub> (nM)	± Éc.T.	B <sub>max</sub> (pMol/mg)	± Éc. T.	N
WT	0.7	0.4	0.9	0.3	3
F77M/N111W	n.d.		n.d.		n.d.
N111W/L112M	7.2	2.4	0.5	0.4	3
N111W/Y113M	28.4	7.5	0.5	0.3	3
N111W/N200M	1.3	0.3	0.9	0.3	3
N111W/F249M	19.0	6.6	0.5	0.1	3
N111W/W253M	2.2	1.2	0.6	0.3	3
N111W/H256M	3.1	1.0	0.6	0.3	3
N111W/T260M	18.5	5.3	0.3	0.1	3

**Tableau 4.1 :** Affinités et expressions des doubles mutants N111W testés. Les résultats sont présentés avec ± un écart type. Les doubles mutants N111W/L112M, N111W/Y113M, N111W/F249M et N111W/T260M ont une perte non négligeable d'affinité et/ou d'expression. L'affinité (K<sub>d</sub>) est exprimée en nM et l'expression B<sub>max</sub> est exprimée en pMol/mg de protéine.

### Temperature dependant labelling ratios

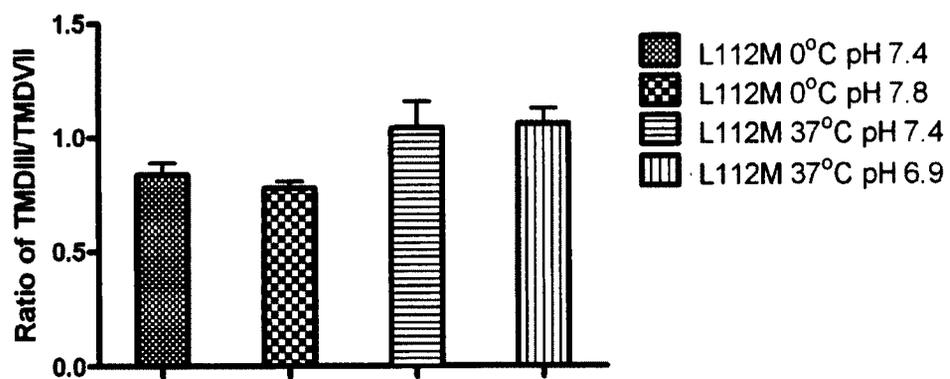


**Figure 4.1:** Photomarquage température dépendant des mutants H256M, N111G/H256M et N111W/H256M. Les ratios indiqués sont le signal du DTMVI divisé par le signal du DTMVII. Les points sont indiqués avec une barre d'erreur représentant  $\pm 1$  écart type.

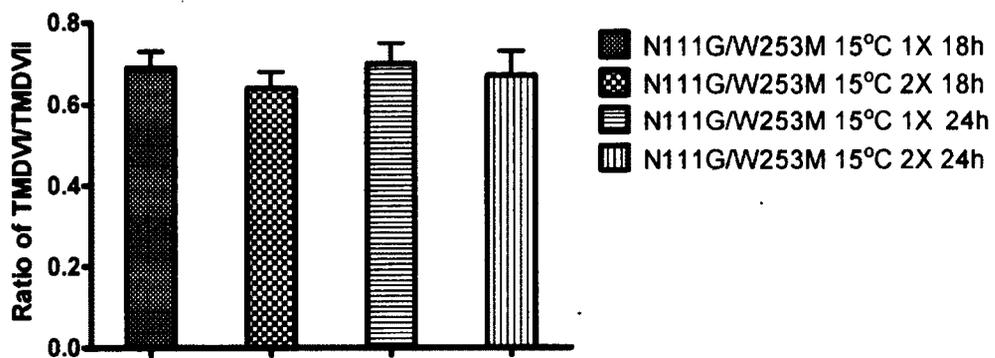
Pour vérifier la contribution du pH, le mutant L112M a été photomarké à 0 et à 37°C soit avec un tampon préparé pour la condition de photolyse où le pH a été ajusté à 7,4 ou un tampon dont le pH a été ajusté à température de la pièce. Les lectures de pH ont été prises à la même température de photolyse que les échantillons. Voir figure 4.2. Il n'avait aucune différence significative dans les ratios du signal correspondant au DTMIII divisé par le signal correspondant au DTMVII des échantillons photomarkés à un pH variant entre 6,9 à 7,8  $\pm 0,1$ . Le mutant Y113M ne démontrait pas non plus de changement en fonction du pH (résultats non présentés).

Pour vérifier la contribution de la digestion au CNBr, nous avons utilisé le mutant N111G/W253M. Le mutant photomarké identiquement à 15°C fut digéré avec une concentration standard de CNBr (1X) ou une double concentration (2X) et laissé pour 18 h ou 24 h avant de terminer la réaction en ajoutant 1mL d'eau. Voir figure 4.3. Suivant la migration sur gel SDS-PAGE (16,5% acrylamide) et la quantification des bandes, il n'y avait aucune différence significative entre ces conditions de digestion.

Dans le but de confirmer la présence de récepteur actif à basse température, la production d'Inositols triphosphates a été analysée à 4 et 37°C. Les résultats à 37°C sont corrélatifs avec les études précédentes sauf qu'il n'y a pas eu de correction du signal en fonction de l'expression dans notre cas (Auger-Messier *et al.*, 2003). De plus, l'analyse de cpm brute varie énormément d'une expérience à l'autre et donc les écarts types sont élevés, cependant en termes de pourcentage de réponse ils seront plus petits. À 4°C, il y a une tendance semblable, mais beaucoup moins ample (voir figure 4.4). Ceci est dû au fait que non seulement le récepteur, mais toutes les composantes du système sont aussi ralenties.

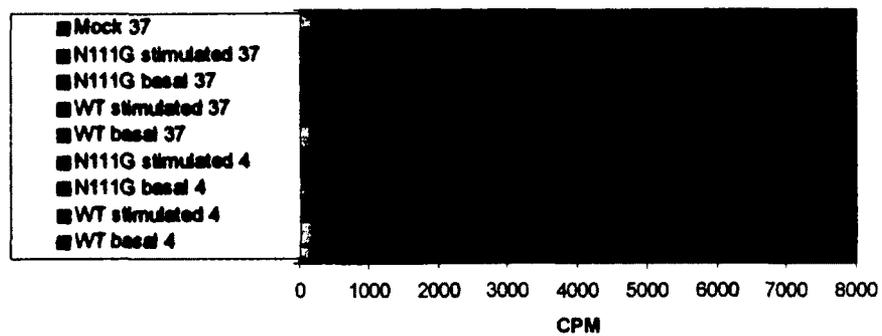


**Figure 4.2 :** Photomarquage en fonction de la température où le pH a été contrôlé. Les bandes démontrent le ratio du signal du DTMIII/DTMVII. Il n'y avait aucune différence significative entre les ratios obtenus à 0°C ni à 37°C dans une étendue de pH entre 6.9 et 7.8.



**Figure 4.3 :** Photomarquage en fonction de la température suivie de différentes conditions de digestion au CNBr. Le même mutant dans ce cas le N111G/W253M fut photomarké à 15°C et il fut ensuite digéré avec une concentration standard (1X) ou double (2X) et il fut laissé pour 18 ou 24 h. Il n'y avait aucune différence significative dans le ratio du signal du DTMVI divisé par le DTMVII entre les 4 conditions.

### Production d'Inositol triphosphate à 4 et 37°C

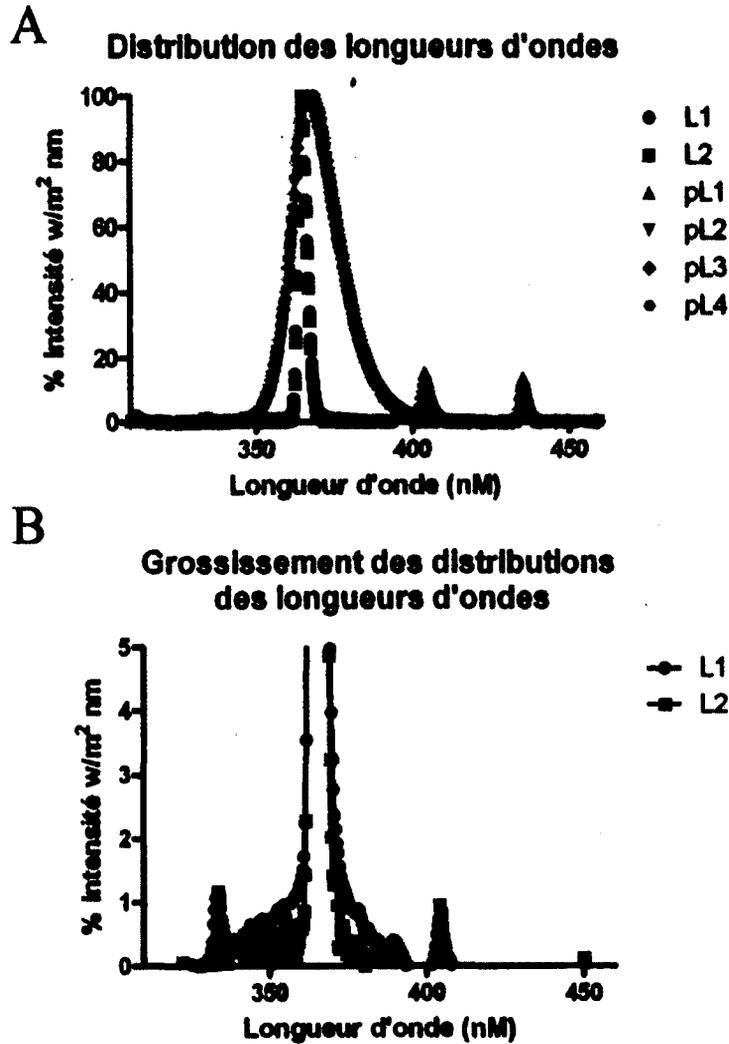


**Figure 4.4 :** Production d'Inositols Phosphate en fonction de la température. Les IPs totaux et bruts sont exprimés en cpm. Les stimulations correspondent à l'ajout de 100 nM d'AngII.

Nous pouvons voir qu'à 4°C il y a quand même une fraction plus élevée de cpm due au récepteur N111G comparé au récepteur WT. Les signaux ne furent pas convertis en pourcentage, car le maximum est différent à chaque température ainsi que le  $B_{\max}$ .

En ce qui concerne la comparaison des lampes (L1 et L2 sont deux lampes à 100 W utilisées dans les expériences précédentes et pL1 à pL4 sont 4 petites lampes utilisées dans la nouvelle méthodologie) le spectre d'émission est très semblable. Elles ont tout un maximum à environ 360 à 365 nM (voir figure 4.5A). Le maximum des lampes L1 et L2 est énorme, ce qui est attendu d'une intensité lumineuse beaucoup plus intense. À première vue, il semble que l'étendue des longueurs d'onde des vieilles lampes L1 et L2 soit plus précise, par contre étant donné que l'intensité est très élevée au maximum il y a un effacement de la distribution réelle. Le signal était sursaturé donc nous avons eu besoin d'éloigner les lampes de l'ouverture à plus de 70 cm au lieu de 10 cm pour les lampes pL1 à pL4. Si nous faisons un agrandissement de la région 1 à 5 % de l'intensité maximal des grosses lampes, nous voyons une distribution très semblable aux petites lampes (voir figure 4.5B). Le pic observé à 330-335 nM qui est approximativement 1 % du signal maximal de 360-365nM n'est pas observé dans les petites lampes.

La nature du marquage méthionine, c'est-à-dire le marquage du carbone  $\epsilon$  versus le carbone  $\gamma$  a été investigué. Nous avons ensuite vérifié si cette nature avait une corrélation avec le ratio de photomarquage. Chaque mutant avait son propre signal de  $\gamma$  versus  $\epsilon$ . Ceux-ci n'avaient pas de corrélation avec le ratio du marquage méthionine versus DTMVII.



**Figure 4.5 :** Distribution des longueurs d'onde des lampes UV. La figure A démontre une distribution des valeurs maximales où les plus hautes valeurs sont normalisées à 100 %. L1 et L2 sont les anciennes lampes de 100 W utilisées dans les études précédentes et les lampes pL1 à pL4 sont celles utilisées dans les expériences actuelles. La figure B démontre un agrandissement de la distribution des lampes L1 et L2.

Cette conclusion repose sur le fait que les résidus qui démontrent un ratio du marquage méthionine/DTMVII très faible n'avaient pas nécessairement un ratio de  $\epsilon/\gamma$  élevé (le marquage  $\epsilon$  serait élevé si la chaîne latérale de la méthionine était étirée pour atteindre le Bpa). Il n'y avait pas d'augmentation significative en fonction de l'activation ni la température pour tous les mutants testés. En prenant la valeur du ratio  $\epsilon/\gamma$  obtenue à 0°C de chaque mutant qu'on soustrait de la valeur à 37°C nous avons une valeur qui approche 0. Il y avait une augmentation non significative dans le ratio de  $\epsilon/\gamma$  de  $0,04 \pm 0,5$  (n=106) en fonction de la température. La température ne change pas le ratio  $\epsilon/\gamma$ . La figure 4.6 démontre les ratios  $\epsilon/\gamma$  moyen de chaque position. Toutes les positions vérifiées étaient significativement différentes ( $p < 0,05$ ) les uns des autres positions dans leur ratio  $\epsilon/\gamma$  sauf pour les positions 77, 253 et 260 qui n'étaient pas différentes entre elles. La position 200 était aussi différente des autres positions sauf pour la position 77 qui n'était pas significativement différente (95% de confiance).



**Figure 4.6 :** Les ratios  $\epsilon/\gamma$  de tous les mutants ont été quantifiés indépendamment de la température et de l'activation. Tous les mutants étaient significativement différents de tous les autres ( $p < 0.05$ ) à l'exception de F77M, W253M et T260M qui n'étaient pas différents l'un des autres (à 95 % d'intervalle de confiance). Le mutant N200M était différent de tous les autres sauf pour le F77M (à 95 % d'intervalle de confiance).

## 5. Discussion

En étudiant la structure des protéines des organismes homeothermiques, il est évident qu'une importance doit être accordée à l'étendue des mouvements permise par la flexibilité structurale à température physiologique. Cette flexibilité serait nécessaire pour le bon fonctionnement des protéines et des molécules (Cozzini *et al.*, 2008; Kenakin, 2007). Cependant, les approches biophysiques requièrent souvent une méthodologie où les protéines impliquées sont maintenues à faible température (Okada *et al.*, 2004). Nous avons donc besoin d'autres méthodes structurales pour améliorer les connaissances générales (Ahuja et Smith, 2009; Kobilka et Schertler, 2008).

De nos jours, la nature des interactions entre macromolécules ne doit plus être vue simplement d'une perspective mécanique, mais demande plutôt une approche par probabilités (Kenakin, 2004; Kenakin, 2007). La conversion entre les conformations, l'étendue des mouvements du complexe, la panoplie de modulateurs allostériques et la nature sélective des ligands font en sorte que le nombre d'états d'un récepteur est quasi incalculable (Christopoulos et Kenakin, 2002; Kenakin, 2007; Urban *et al.*, 2007; Vauquelin et Van Liefde, 2005). Les résultats cristallographiques, bien qu'ils démontrent la structure à très haute résolution, ne permettent pas de voir les variations conformationnelles que nécessitent les protéines à température physiologique (Cozzini *et al.*, 2008; Kobilka et Schertler, 2008). Nous voyons seulement une perte de résolution dans les régions fluctuantes (par exemple les boucles extracellulaires des RCPGs). L'approche détaillée dans cette thèse permet de voir, de façon

thermiquement contrôlée, les étendues de mouvement permises par un ligand en complexe avec son récepteur.

Les résultats de la première étude démontrent que la température de photolyse doit être étroitement contrôlée pour permettre une reproductibilité des résultats. À plus haute température (37°C), la flexibilité du complexe est amplifiée. Cependant, cette température de photolyse permet d'analyser le récepteur dans son dynamisme physiologique. Puisque le Bpa va réagir beaucoup plus rapidement avec les méthionines, un accroissement des mouvements inter- et intramoléculaires du complexe ligand/récepteur vont faire en sorte que le Bpa a plus de probabilités de toucher une méthionine (rayon d'action augmenté) et va pousser le rendement de la réaction en faveur du marquage de la méthionine au détriment du marquage du DTMVII (Perodin *et al.*, 2002; Wittelsberger *et al.*, 2006). Pour voir une structure plus rigide et moins dynamique, le photomarquage à basse température permet de minimiser l'étendue des mouvements du complexe ligand/récepteur. Donc, le Bpa va se lier principalement sur un atome dans son voisinage immédiat (TMVII). Ceci va augmenter la résolution du photomarquage.

La seconde étude qui comprend le photomarquage de tous les mutants positifs au MPA qui ont été photomarqués à 0 et 37°C nous transmet de l'information importante sur l'activation du récepteur. Le mutant constitutivement actif (N111G) a été muté une seconde fois pour avoir une méthionine aux mêmes endroits que le récepteur WT. En utilisant le ratio des régions de marquages, nous sommes capables de catégoriser les points de contact en fonction de leur accessibilité. Ces ratios ont démontré des changements significatifs entre les états d'activations du récepteur hAT<sub>1</sub>.

Les études précédentes de MPA (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005) ont été cruciales pour l'élaboration de la présente étude pour retrouver à partir de centaines de mutants ceux qui sont orientés vers la pochette de liaison. Cependant, certaines variabilités dans les résidus de contact doivent être élucidées, c'est-à-dire que le mutant N111G/T260M (3.35/6.55) n'était pas un point de contact. Dans l'étude actuelle, nous voyons une diminution du ratio de marquage de la méthionine de ce mutant, mais le signal par densitométrie est toujours significativement supérieur au signal du bruit de fond du N111G. Il est donc maintenu comme point de contact bien qu'il soit très faible. L'autre divergence est l'absence des points de contact F77M (2.53) et N200M (5.43) dans le récepteur WT (Clement *et al.*, 2009). Ces deux résidus démontrent une diminution du marquage de la méthionine dans le récepteur WT par rapport au N111G, mais ils sont significativement plus élevés que le bruit de fond dans le récepteur WT. Tous les résidus sont toujours accessibles dans les deux formes (N111G et WT) mais leur degré d'accessibilité change en fonction de l'activation. L'absence de ces points de contact dans les études précédentes serait le résultat d'une discrimination trop rigoureuse durant l'identification des points de contact. Si les auteurs avaient coupé leurs gels et compté la radioactivité ou exposé le gel plus longtemps, il se pourrait bien que ces résidus aient aussi été retrouvés. Malgré tout, les résultats antérieurs et actuels sont cohérents.

Le photomarquage des résidus proximaux des points de contact ( $i \pm 2$ ) obtenus dans les études précédentes n'a pas donné de nouveaux points de contact une fois photomarké à 37°C. Ceci démontre bien que la méthode de MPA avec les anciennes lampes (L1 et L2 : voir section 4.2) est parfaitement adéquate pour retrouver tous les points de contact dans une première étude de criblage à haut débit.

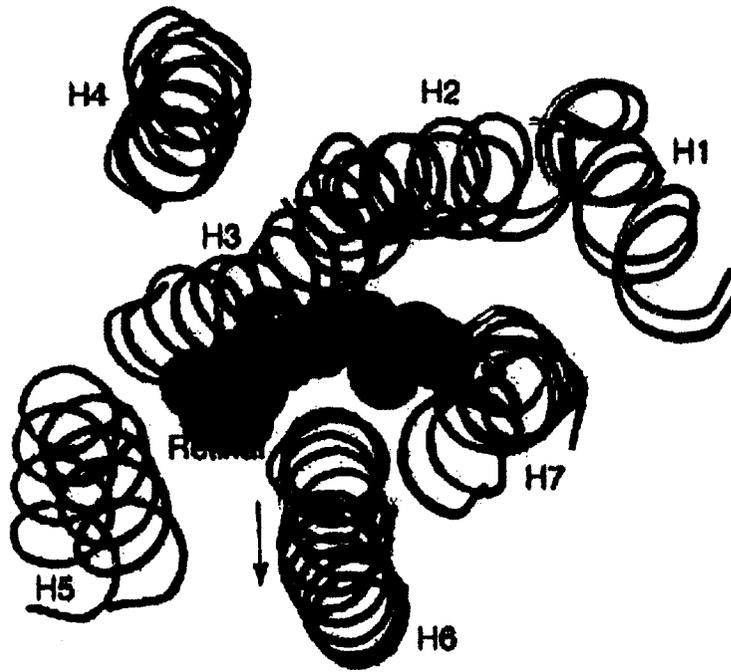
Ces études ont caractérisé les mutants utilisés dans les études présentées dans cet ouvrage. Tous les mutants ayant une affinité dans les environs de 1 nM pour le photoanalogue [Sar<sup>1</sup>,Bpa<sup>8</sup>] AngII, sont activables à la quasi-totalité du WT en présence de 100 nM d'AngII et les doubles mutants N111G ont tous une activité constitutive comparable au N111G (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2006; Clement *et al.*, 2005).

Lorsqu'on compare l'homologie structurale des points de contact de la position 8 du [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII dans hAT<sub>1</sub>, on constate qu'ils sont importants pour la pochette de liaison du rétinol dans la rhodopsine. Le résidu F293M (7.44) est plus élevé que le rétinol dans la rhodopsine bovine 296K (7.43) (Ahuja et Smith, 2009). Les résidus L112M (3.36), Y113M (3.37), N200M (5.43), W253M (6.48) et H256M (6.51) retrouvés comme point de contact dans hAT<sub>1</sub> sont aussi impliqués dans l'interaction de la rhodopsine avec le rétinol (Ahuja et Smith, 2009). Étant donné la haute corrélation structurale de ces points de contact, il est logique de concevoir que le mécanisme d'activation de hAT<sub>1</sub> soit au moins semblable à celle de la rhodopsine. Puisque la rhodopsine fut cristallisée sous sa forme opsine (sans l'agoniste inverse le *cis*-rétinol), la comparaison entre les changements conformationnels des modèles a démontré des similitudes avec les résultats de la méthode présenté ici.

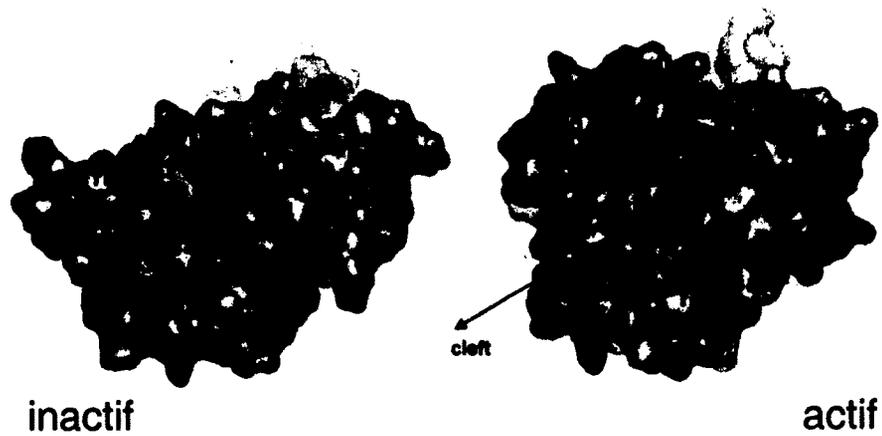
Nos résultats suggèrent un éloignement du DTMVI, un déplacement (ou potentiellement une rotation antihoraire) du DTMIII, un rapprochement du DTMII et V et un rapprochement conséquent du DTMVII. Tous ces changements sont observés durant la modélisation par classement hiérarchique des points de contact du récepteur hAT<sub>1</sub> obtenus lors d'expériences de photomarquage. Quand nous comparons nos résultats avec ceux obtenus par cristallographie de la rhodopsine et de l'opsine, nous

pouvons remarquer les mêmes changements conformationnels (voir figure 5.1.) (Ahuja et Smith, 2009). Le plus gros changement perçu est celui du DTMVI qui s'éloigne de la cavité centrale. On peut aussi percevoir les mouvements vers l'intérieur du DTMII, V et VII, ainsi qu'une petite rotation antihoraire et/ou un déplacement du DTMIII. Ces résultats qui sont très comparables aux nôtres nous démontrent que la méthode actuelle peut nous donner de l'information très précise sur les changements conformationnels survenant durant l'activation constitutive. De plus, l'éloignement du DTMVI et le rapprochement du DTMVII ont aussi été observés par dynamisme moléculaire sur la rhodopsine dans une autre étude (voir figure 5.2) (Bhattacharya *et al.*, 2008).

La modélisation moléculaire de hAT<sub>1</sub> nous permet de placer le ligand à l'intérieur du récepteur en lui donnant des contraintes de distance avec les résidus qui peuvent former un lien covalent avec le [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. Dans les études présentées dans cet ouvrage, nous sommes capables de donner différentes distances inversement proportionnelles au ratio d'accessibilité. Ce ratio d'accessibilité a été obtenu à partir de l'analyse densitométrique des fragments correspondants à l'incorporation du Bpa sur la méthionine mutée ou sur le DTMVII. En utilisant Adobe Photoshop 7.0, nous sommes capables de bien isoler et quantifier les bandes en termes d'intensité et de grosseur. La relation 1 pour 1 entre ces deux facteurs démontre la meilleure corrélation ( $R^2=0.94$ ) de la densitométrie avec le comptage de gel direct (voir figure 3.S1). Ces deux méthodes d'analyse sont également efficaces. L'hypothèse de travail est qu'un ratio de marquage de la méthionine élevé serait associé avec une distance plus faible (plus de chance de collision) et inversement. Un ratio de marquage élevé démontrerait une meilleure accessibilité.



**Figure 5.1 :** Activation de la rhodopsine. Vue topographique (extracellulaire) des changements conformationnels observés durant le mécanisme d'activation de la rhodopsine. En gris la forme inactive et en orange la forme active. Les DTMs sont notés de H1 à H7 ainsi que le rétinale en rouge. Figure tirée de Ahuja *et al.*, 2009.



**Figure 5.2:** Activation de la rhodopsine par dynamisme moléculaire. Vue topographique (intracellulaire) des changements conformationnels de la rhodopsine observés par dynamisme moléculaire. À gauche la conformation inactive et à droite la conformation active. Le récepteur actif adopte une conformation plus large avec le DTMVI (TM6) qui s'éloigne et le DTMVII (TM7) qui se rapproche. Figure tirée de Bhattacharya *et al.*, 2008.

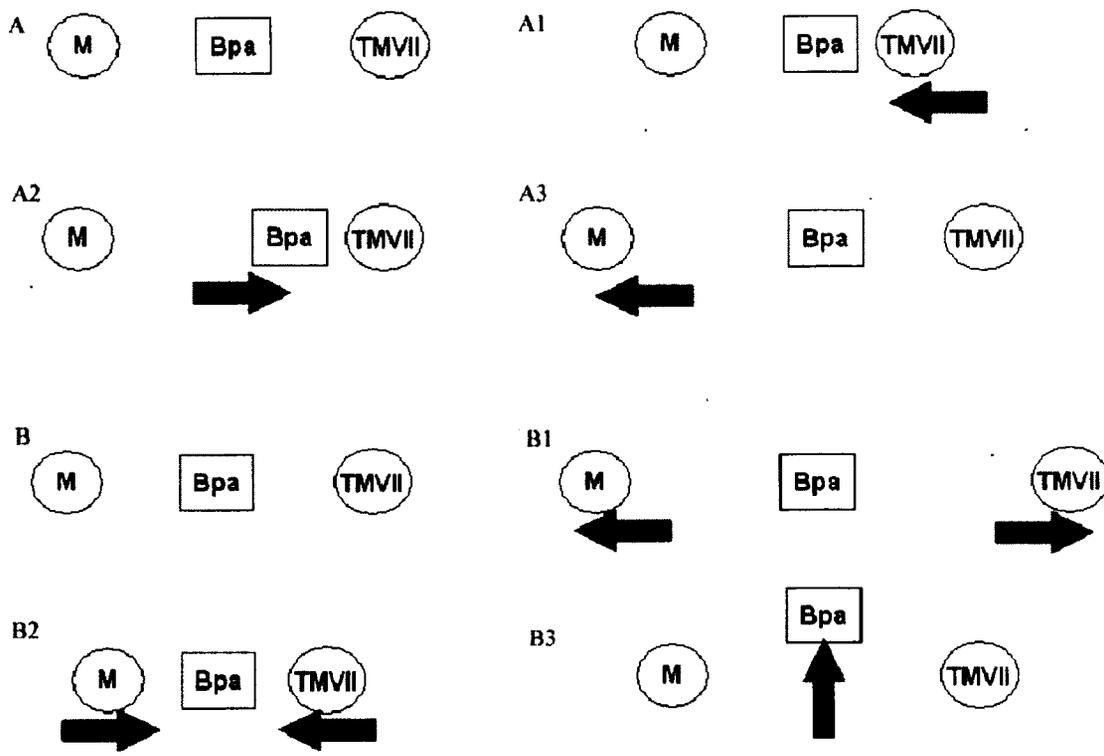
Il est très difficile de déterminer la distance exacte entre le Bpa et le résidu testé à partir du ratio de photomarquage. Les chances de collision avec la méthionine dépendent de la flexibilité du complexe. Nous savons tout de même que la distance est proportionnelle à l'accessibilité. Mais il faut tenir en compte, qu'il soit possible qu'un résidu soit très près, mais qu'il ne soit pas orienté dans la bonne direction. Par exemple, on sait qu'un seul résidu par tour d'hélice du DTMVI (F249M, W253M, H256M et T260M) est accessible au photomarqueur (Clement *et al.*, 2005). Comme dans le cas de la distance entre F250M et F249M qui est plus petite que celle entre F249M et T260M. Même en chauffant à 37°C, les mutants méthionines des autres positions du DTMVI ne deviennent jamais accessibles. Donc, une relation directe entre le ratio et une distance est presque impossible à déterminer, car elle dépend de la flexibilité du complexe et de l'orientation des résidus.

La formule utilisée pour les modèles moléculaires est démontrée dans la section « matériels et méthodes » du 2<sup>e</sup> article (section 3.3). Les ratios sont transformés en un pourcentage qui est soustrait du 100 % et le résultat suivant est multiplié par 15 Å. La distance de 15 Å est déterminée par le fait qu'il pourrait y avoir une distance maximale de 7,5 Å entre le Bpa et le carbone  $\beta$  du résidu natif 293F dans le DTMVII (Perodin *et al.*, 2002) et 7,5 Å diamétralement opposés entre le Bpa et le carbone  $\beta$  du résidu muté en méthionine ( $2 \times 7,5 \text{ \AA} = 15 \text{ \AA}$ ).

Dans le cas d'un ratio de 1, c'est-à-dire que le Bpa marque autant le DTMVII que la méthionine mutée, ce ratio serait de 50 % et la distance insérée durant la modélisation serait de 7,5 Å entre le carbone de la cétone du Bpa et le carbone  $\beta$  de la chaîne latérale du résidu en question. Un photomarquage dont le ratio est 1 ferait en sorte que la distance insérée comme contrainte dans la modélisation serait la même

que celle utilisée dans les études précédentes (inférieure à 7,5 Å) (Clement *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2005; Holleran *et al.*, 2007). Par contre, si le ratio est  $> 1$ , c'est-à-dire que la méthionine est davantage accessible, la distance est plus petite et inversement. Les résultats modélisés ici sont ceux obtenus à 0°C pour minimiser l'étendue des mouvements du complexe (meilleure résolution). En réalité, les distances pourraient bien être plus courtes que 7,5 Å, mais nous nous laissons une marge d'erreur conservatrice. Pour valider notre formule, nous avons aussi utilisé une formule plus contraignante de 12 Å ( $2 \times 6 \text{ Å} = 12 \text{ Å}$ ). Les résultats obtenus sont très comparables sauf pour l'amplitude des mouvements observés qui est un peu plus élevée que les mouvements obtenus à partir de la formule de 15 Å. Malgré tout, nous avons maintenu la formule de 15 Å pour minimiser les erreurs induites par l'insertion de contraintes trop rigides dans la modélisation (torsion exagérée induite par le logiciel pour satisfaire aux contraintes). Cela a peut-être été le cas pour les résidus T260M, F77M/N111G et N111G/N200M dans les études précédentes.

Contrairement au cas d'une contrainte de distance trop petite insérée dans la modélisation, une distance trop élevée pourrait être insuffisamment contraignante. Des contraintes trop éloignées pourraient ne pas affecter la conformation étant donné qu'elles seraient satisfaites dès le départ. Le choix de ces contraintes de distances est donc très important pour la modélisation subséquente. Nous n'avons pas non plus inséré de molécules d'eau et de lipides durant la modélisation, car nous avons pour l'instant insuffisamment d'informations sur le positionnement de ceux-ci. Ces composantes sont évidemment importantes pour la stabilité structurale (Pardo *et al.*, 2007). Les changements de ratio pourraient s'interpréter de différentes façons à cause de changements conformationnels possibles (voir figure 5.3).



**Figure 5.3 :** Changements conformationnels pouvant affecter le ratio de photomarquage. A et B sont les situations initiales. Le ratio va diminuer dans les conditions suivantes : si le DTM VII se rapproche du Bpa (A1), si le Bpa se rapproche du DTMVII (A2) et si la méthionine s'éloigne du Bpa (A3). Un ratio qui augmente démontrerait les mouvements inverses. Le ratio resterait semblable dans les conditions suivantes : s'il n'y a aucun changement (B), si la méthionine et le DTMVII s'éloignent proportionnellement (B1), si la méthionine et le DTMVII se rapprochent proportionnellement (B2) et si le Bpa se déplace dans une direction ne favorisant aucune des extrémités (B3).

Il faut aussi noter que le photomarquage des mutants N111G ne démontre pas nécessairement la forme active, mais plutôt une population de récepteur dans laquelle on peut retrouver plus de récepteurs actifs que dans celle du WT. Les différences mesurées entre les ratios ne seraient qu'un facteur de ces populations. En réalité, les changements conformationnels menant à la forme active complète seraient d'une amplitude plus élevée que les différences observées entre les récepteurs WT et N111G. Néanmoins, en utilisant la formule de 15 Å pour les mutants du 111N et du N111G, nous avons observé des changements structurels relatifs au niveau d'activation. De plus, la contribution des modulateurs allostériques tels que la protéine G ne peut pas être isolée. Les résultats que nous obtenons sont donc la somme de toutes les conformations possibles et reposent sur les populations de ces conformations. Il serait intéressant d'essayer cette étude en présence d'un GTPγS pour analyser la contribution de la protéine G à la pochette de liaison. Néanmoins, cette avenue ne serait qu'utilisable dans le récepteur WT car le N111G est connu pour maintenir son état d'haute affinité couplée ou non de la protéine G (Auger-Messier *et al.*, 2003). De plus, la méthode élaborée dans cet ouvrage ne peut pas non plus tenir en compte les effets des autres protéines auxiliaires qui modulent l'activité de hAT<sub>1</sub>. Nous ne pouvons voir que la population totale de ces récepteurs. Néanmoins, une étude plus élargie sur la nature agoniste pléiotropique du <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] nous permettrait de mieux caractériser les changements conformationnels observés.

Plus précisément, ces changements impliquent le résidu 77F (2.53). Ce résidu a été démontré comme étant orienté vers la pochette de liaison dans le mutant constitutivement actif dans des études précédentes (Clement *et al.*, 2009; Domazet *et al.*, 2009). On ne voit pas d'augmentation significative du ratio du mutant

F77M/N111G par rapport au F77M. Ce résidu est favorablement orienté dans notre modèle vers le résidu 108V (3.32) du DTMIII pour y former des interactions Van der Waals. Les interactions hydrophobes entre le DTMI et DTMIII pourraient stabiliser la conformation inactive et elles sont aussi observées dans la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009). Le résidu 77F peut être muté pour augmenter l'activité constitutive de hAT<sub>1</sub> (Nikiforovich *et al.*, 2005) qui corrobore aussi l'interaction stabilisante avec le DTMIII dans la forme inactive.

En observant les résidus dans le DTMIII, nous pouvons voir des changements dans l'accessibilité des résidus analysés. Le résidu L112M (3.36) démontre un ratio relativement élevé, mais ne change pas significativement avec l'ajout de la mutation N111G. Les résultats démontrent que ce résidu est encore accessible dans ces deux formes (aucune différence significative dans un intervalle de confiance de 95%). Dans la rhodopsine, le résidu 3.36 est une glycine qui interagit par contact Van der Waals avec la chaîne polyène du *cis*-rétinal, ce qui stabilise le récepteur dans sa conformation inactive. Cependant, dans le récepteur hAT<sub>1</sub>, le résidu 112L est orienté vers le DTMVI. Plus précisément, le résidu 112L pourrait interagir avec les résidus 249F (6.44) et 253W (6.48), deux des résidus qui forment la région polyaromatique hautement conservée (Ahuja et Smith, 2009). Ces interactions pourraient stabiliser le récepteur sans ligand dans sa forme inactive. Ce résidu a aussi été observé dans le récepteur de la sérotonine, le 5HT<sub>2C</sub>, pour avoir un rôle stabilisant de la conformation inactive (Visiers *et al.*, 2002). Par conséquent, une rotation antihoraire ou un déplacement du DTMIII briserait ces interactions. Notre modèle précédant indique que le Bpa<sup>8</sup> se retrouve entre ces points de contact (Clement *et al.*, 2005). Parallèlement, le résidu 112L a aussi été lié à une activité constitutive suivant sa

mutation (Nikiforovich *et al.*, 2005) et ceci corrobore bien l'interaction stabilisante du résidu 112L pour maintenir le récepteur dans la conformation inactive.

Le résidu Y113M (3.37) démontre une augmentation du ratio de marquage de la méthionine dans le N111G comparé au WT. Il est aussi le seul point de contact dans le N111G ayant une augmentation significative du ratio de marquage. Donc, avec ce résidu nous pouvons postuler une rotation du DTMIII. Dans notre modèle, le résidu Y113M (3.37) est orienté favorablement pour former une liaison hydrogène avec le résidu 199L (5.42) et cette interaction est plus rapprochée dans le modèle N111G. Le résidu 199L (5.42) est important pour la liaison de l'AngII dans hAT1, car il interagit potentiellement avec le carboxyle terminal (de Gasparo *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). Dans la rhodopsine, le résidu 207M (5.42) forme une interaction Van der Waals avec le *cis*-rétinal (Ahuja et Smith, 2009). Une petite rotation du DTMIII orienterait le résidu Y113M davantage vers la cavité hydrophobe créée par les résidus aromatiques du DTMVI. Cette tyrosine polaire pourrait contribuer à déstabiliser la cavité polyaromatique et pousser le récepteur dans une conformation active suivant la rotation ou un déplacement du DTMIII. Le récepteur de la mélanocortine 4 a aussi été observé par chélation d'ions métalliques pour faire une rotation antihoraire du DTMIII durant l'activation (Lagerstrom *et al.*, 2003).

Les résidus 125D (3.50), 126R (3.51) et 127Y (3.52) dans la région inférieure du DTMIII sont plus conservés de ce DTM. Ils contribuent à maintenir le récepteur dans sa conformation inactive en formant un pont salin avec le résidu 236D (6.31) qui est l'analogue du 297E (6.30) dans la rhodopsine (Alewijjnse *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2008). Un mouvement du DTMIII pourrait rompre l'interaction ionique stabilisant la conformation inactive du domaine DRY.

Dans le DTMV, nous avons un seul résidu pour l'analyse. La position N200M (5.43) ne démontre aucune différence significative dans le ratio en fonction de l'état d'activation du récepteur. Néanmoins, on remarque une petite augmentation du ratio qui pourrait indiquer un rapprochement mineur du DTMV. De plus, ce résidu possède les ratios de photomarquages les plus faibles de tous les mutants. Toutefois, il serait orienté vers la pochette de liaison du [Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII. L'importance du résidu 200N pour la liaison de l'AngII a été précédemment démontrée (Hunyady *et al.*, 1998). Dans la rhodopsine, le résidu homologue 208F (5.43) interagit avec le *trans*-rétinal dans la conformation active de la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009). Parallèlement, l'aperçu du nouveau point de contact N111G/N200M dans hAT<sub>1</sub> démontre bien que ce résidu est rapproché dans ce modèle (Clement *et al.*, 2009). Dans la conformation inactive, le résidu 200N est bien orienté pour interagir avec le 260T dans le DTMVI et il pourrait former une liaison hydrogène avec celui-ci pour maintenir le récepteur dans sa conformation inactive. Durant l'activation, un rapprochement du DTMV pourrait briser ce lien stabilisant. Synergiquement avec la rotation du DTMIII, le rapprochement du 200N polaire et du 199K chargé du DTMV vers le domaine hydrophobe polyaromatique du DTMVI pourrait contribuer à l'éloignement de celui-ci par rapport à la pochette de liaison.

Le DTMVI comprend 4 résidus pour l'analyse. Les changements de leur ratio sont aussi les plus importants et les plus significatifs du récepteur. Tous les résidus de ce domaine démontrent une perte d'accessibilité avec la mutation N111G. Il pourrait se produire un éloignement du DTMVI par rapport à la pochette de liaison et possiblement une petite rotation antihoraire. Le résidu F249M (6.44) perd presque 50 % de son ratio d'accessibilité suivant la mutation N111G. Cependant, il démontre

le plus haut ratio du DTMVI à 0°C dans ce modèle. Ce résidu de même que le résidu 253W forment la face polyaromatique du DTMVI qui est hautement conservé dans la famille rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009; Ballesteros *et al.*, 2001; Javitch *et al.*, 1998). Dans la rhodopsine, le résidu 6.44 est l'homologue de la position 261F et celle-ci forme également une face polyaromatique (Ahuja et Smith, 2009). Le résidu 249F est orienté directement vis-à-vis le résidu 112L et pourrait former des interactions hydrophobes avec celui-ci. Il pourrait favoriser le maintien du récepteur dans sa conformation inactive. La présence d'un agoniste ou d'une mutation constitutivement active pourrait perturber l'interaction entre le DTMIII et VI et favoriser la conversion vers la forme active. Le marquage relativement élevé de ce résidu dans le mutant N111G, en comparaison aux autres résidus de DTMVI, nous indique que le ligand pourrait potentiellement pénétrer plus creux dans la pochette de liaison durant l'activation. Certains changements structuraux résultant de cette pénétration pourraient être nécessaires pour traduire les signaux vers la protéine G. Cela dit, il est possible qu'un agoniste complet pénètre plus profondément dans la pochette de liaison qu'un antagoniste neutre ou partiel et que l'accommodation conformationnelle de cette descente soit nécessaire à la transduction du signal.

Le second résidu du DTMVI étudié est le W253M (6.48). Nous remarquons toujours une diminution significative du ratio de marquage méthionine du mutant N111G/W253M comparé au mutant W253M. Ce résidu fait partie de la face polyaromatique du DTMVI et il est aussi impliqué dans le «tryptophan switch» ou le «rotomer toggle switch» (Ahuja et Smith, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2002). Le résidu en 6.50 est la proline 255P responsable de maintenir un pli dans l'hélice  $\alpha$  de ce DTM. Cette proline, qui est la plus conservée du DTMVI dans la

famille de rhodopsine, est importante pour l'orientation favorable du haut du DTMVI durant l'activation des récepteurs de cette famille (Ahuja et Smith, 2009; Shi *et al.*, 2002). Le résidu W253M est le résidu qui démontre le plus haut ratio dans le récepteur natif à 0°C. C'est pourquoi il semble avoir une importance clé pour la liaison du ligand et l'activation du récepteur. Ce résidu a aussi démontré être constitutivement actif suite à sa mutation (Nikiforovich *et al.*, 2005). Il pourrait donc avoir des interactions stabilisantes avec le DTMIII pour stabiliser la forme inactive du récepteur. L'insertion de la phénylalanine en position 8 de l'agoniste AngII pourrait venir perturber ces interactions et favoriser la transition vers la forme active. Suite à l'éloignement du DTMVI adviendront des compensations structurales dans la forme active. Dans le modèle moléculaire du N111G, le résidu 253W (6.48) est davantage orienté vers le résidu 204F (5.47) et il est suffisamment près pour former des interactions Van der Waals avec ce résidu pour aider à stabiliser la conformation active du récepteur. La réorientation du résidu 6.48 vers le DTMV durant l'activation est aussi observée dans la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009).

Le résidu H256M (6.51) possède quelques particularités. Tout comme les autres mutants du DTMVI, il devient moins accessible en présence de la double mutation N111G. Cependant, ces résidus présentent une augmentation drastique du marquage de la méthionine lorsque la température de photolyse augmente. À 0°C ils ne sont pas les plus accessibles. Par contre, à 37°C, les ratios des mutants H256M et N111G/H256M surpassent les ratios des autres mutants. La mutagenèse aux méthionines est reconnue pour diminuer la température de fonte à 50 % ( $T_m$ ) des protéines étudiées, principalement aux interfaces des hélices  $\alpha$  (Munson *et al.*, 1996). Par conséquent, une perte de stabilité interne causerait plus facilement une

dénaturation. Analogiquement, l'insertion de méthionines par mutagenèse pourrait équivaloir à chauffer le récepteur. Il est probable que le résidu 256H soit impliqué dans la stabilité structurale de hAT<sub>1</sub> et que sa mutation augmente l'amplitude des fluctuations conformationnelles. Une fois ce récepteur chauffé à 37°C, les fluctuations favorisent le photomarquage de la méthionine H256M. Cette observation renforce la décision de modéliser les distances obtenues à partir des ratios photomarkés à 0°C. Ce même résidu est un des mieux conservés de ce DTM. De plus, il est un point de contact avec le rétinol dans la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009). Dans le modèle du récepteur WT, le résidu 256H (6.51) est favorablement orienté pour former des liaisons hydrogènes avec les résidus 287T (7.37) et 292T (7.43). L'éloignement du DTMVI, en combinaison avec le rapprochement synergique du DTMVII de la pochette de liaison, ferait en sorte que ces interactions sont toujours possibles dans la conformation active. Ce mouvement synergique a aussi été observé dans la rhodopsine par dynamisme moléculaire (Bhattacharya *et al.*, 2008).

Le résidu T260M (6.55) est le quatrième point de contact dans le DTMVI. Ce résidu présente le ratio le plus faible du DTMVI ; son ratio diminue suite à la mutation N111G. La proline en position 255 (6.50) fait en sorte que le résidu 260T est orienté vers le TMDV. Il est possible qu'il interagisse avec le 200N (5.43) plus particulièrement. Cette interaction pourrait influencer la stabilisation de l'interface du DTMV et VI ainsi que celle de la conformation inactive de hAT<sub>1</sub>. Suite à l'éloignement du DTMVI, cette interaction pourrait être brisée et cela permettrait au DTMV de se rapprocher de la pochette de liaison.

D'autres mouvements des DTMs sont visibles dans les modèles sans que nous leurs ayons donné de contraintes. Des études précédentes démontrent que le DTMVII

se rapproche de la pochette de liaison en absence d'agoniste inverse dans la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009). Il est intéressant de noter que nous avons également observé des changements du DTMVII pour accommoder les contraintes imposées aux autres résidus dans le modèle N111G. Cette observation renforce la validité de notre méthodologie. Puisqu'il se produit un petit rapprochement des DTMII et V sans augmentation significative des ratios d'accessibilité, on peut s'attendre à un rapprochement proportionnel du DTMVII pour maintenir les ratios (voir figure 5.3 situation B2).

Les conclusions des études de SCAM sont intéressantes à comparer, car elles étudient le même récepteur, mais avec une approche différente (telle que décrit dans la section 1.1.4). Ces études élucident l'accessibilité du ligand à partir de certains résidus. La première étude a démontré une insensibilité de certains résidus dans le DTMVII du N111G. Cette observation a induit la conclusion d'un éloignement du DTMVII (Boucard *et al.*, 2003). Cet éloignement n'a pas été observé dans notre étude ni dans d'autres recherches effectuées sur la rhodopsine (Ahuja et Smith, 2009; Bhattacharya *et al.*, 2008). Étant donné que le groupement chargé (MTSEA) utilisé pour bloquer la liaison du [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII dans les études de SCAM est fortement polaire, certaines interprétations erronées pourraient survenir. Dans l'étude sur le DTMVII, les points de contact perdus dans le N111G étaient la position A277C, V280C, A283C et F301C (Boucard *et al.*, 2003). Tous ces acides aminés sont originalement non polaires et ils n'étaient possiblement pas accessibles au MTSEA durant les expériences sur le N111G. Au lieu d'être accessible au MTSEA et ne pas affecter la liaison, il se pourrait tout simplement qu'ils soient devenus inatteignables. De plus, le mutant N111G a subséquemment été démontré d'être plus permissif, voire

accommodant, aux changements du ligand (Fillion *et al.*, 2010). Il est donc possible que l'ajout d'une charge ne modifie pas significativement l'affinité du [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>] AngII dans le N111G. Dans nos modèles, ces résidus sont tous orientés vers le DTMI et non vers la pochette de liaison et ils le sont davantage dans le modèle N111G. L'étude subséquente de SCAM sur le DTMIII a démontré une rotation antihoraire de ce domaine, ce qui concorde très bien avec nos résultats (Martin *et al.*, 2004). Le prochain domaine analysé a été le DTMVI, lequel a démontré une rotation antihoraire durant l'activation et un rapprochement du haut du DTMVI (Martin *et al.*, 2007). Nous pouvons valider cette rotation avec nos modèles, mais pas le rapprochement. Cette divergence dans les conclusions s'explique de la même façon que dans le cas de l'étude sur le DTMVII. Puisque le résidu F261C devient accessible dans le N111G, les auteurs ont conclu à un rapprochement. Par contre, la rotation observée pourrait réorienter le résidu 261 vers la pochette de liaison et être la cause de la sensibilité au MTSEA. De plus, la perte du N111G/F249M et la diminution de l'efficacité du N111G/V264C (encore des résidus nativement non polaires) pourraient être expliquées par un éloignement du DTMVI. L'étude de SCAM sur le DTMII et le DTMV démontre un rapprochement de ces domaines, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude actuelle (Domazet *et al.*, 2009; Domazet *et al.*, 2009). En bref, les conclusions des études de SCAM sont en accord avec les nôtres sauf pour certains rapprochements et éloignements. Par contre, leurs résultats sont davantage compréhensibles à la suite des résultats de l'étude actuelle.

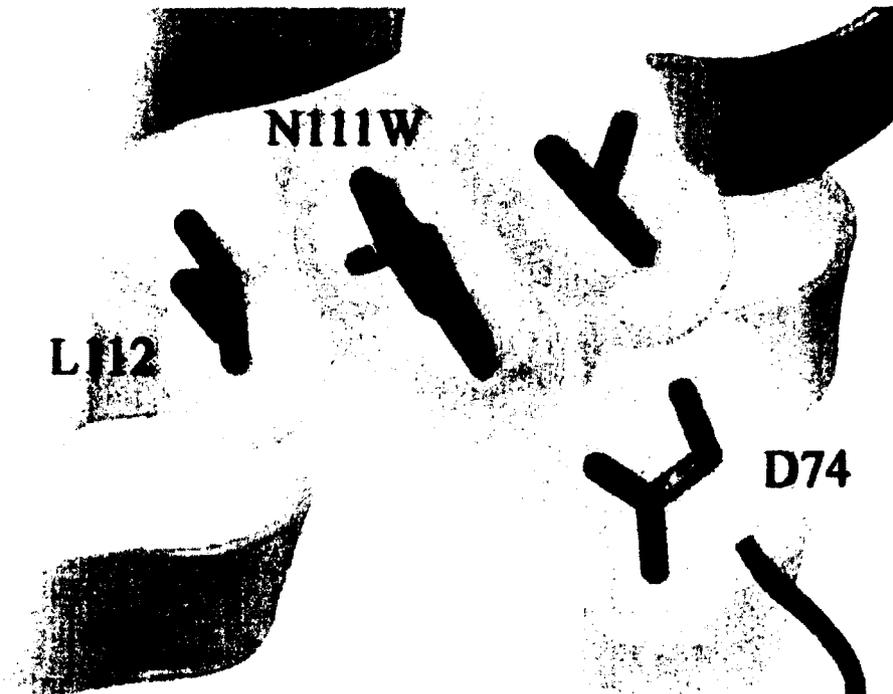
Les bandes digérées au CNBr des récepteurs photomarqués présentent une très bonne reproductibilité. Cependant, la digestion pourrait causer des variations dans les ratios dans les cas suivants : si la cinétique de clivage de certaines méthionines est

grandement différente, si un fragment correspond à la fois au fragment de la méthionine mutée et au fragment du DTMVII ou si le CNBr clive non spécifiquement (ce qui contribuerait à augmenter le signal inférieur à 6 kDa sur le gel SDS-PAGE). Par contre, ces variables ont été contrôlées avec la présence du WT et du N111G respectivement. Dans cette étude, le ratio de chaque mutant est comparé et doit être significativement supérieur au ratio du bruit de fond de leurs homologues non mutés (WT et N111G). De plus, des expériences de cinétique ont été faites pour déterminer si le ratio changeait en fonction du rendement de la digestion au CNBr. Nous avons constaté qu'il n'y avait aucune différence significative entre les ratios de marquage en fonction des différentes conditions de digestion (voir figure 4.3). C'est-à-dire que les intensités des bandes du DTMVII, versus celles qui correspondent aux méthionines marquées, ont proportionnellement augmentées avec la disparition de la bande non digérée supérieure à 30 kDa. Cela indique une cinétique très semblable entre les méthionines endogènes des fragments analysés. De plus, les ratios mesurés varient de moins de 10 % dans tous les cas, même lorsque le rendement n'est pas identique d'une expérience à l'autre. Nous n'avons pas utilisé de mutants méthionines présents dans le DTMVII ni dans le C-terminal, car ils se seraient superposés avec les fragments de photomarquages natifs. Dans ce même ordre d'idée, le ratio des fragments entre 10,0 kDa et 7,1 kDa peut nous donner une bonne indication du rendement de la réaction au CNBr, car la 334M est parmi les résidus les plus difficiles à cliver, car il se retrouve dans un environnement plus aqueux (Clement *et al.*, 2005; Crimmins *et al.*, 2001; Perodin *et al.*, 2002).

Il aurait été intéressant d'utiliser non seulement le mutant N111G, mais aussi le mutant constitutivement inactif, le N111W. Celui-ci présenterait un récepteur

encore moins actif que le WT qui a toujours un peu d'activité constitutive comme la plupart des RCPGs (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002). La modélisation à la figure 5.4 présente des interactions stabilisantes du tryptophane en position 111 avec son environnement immédiat. Dans le mutant N111W, l'activité basale est aussi diminuée et l'activation induite par la présence de 100nM de l'agoniste AngII n'est pas significativement (Auger-Messier *et al.*, 2003). Par contre, suivant la production des mutants N111W/L112M, N111W/Y113M, N111W/N200M, N111W/F249M, N111W/W253M, N111W/H256M et N111W/T260M, nous avons observé par saturation que les mutants N111W/L112M, N111W/Y113M, N111W/F249M et N111W/T260M n'ont pas d'expressions et/ou d'affinités adéquates (voir tableau 4.1). De plus, aucune différence significative entre les ratios du photomarquage du N111W/H256M et le H256M n'a pu être observée (voir figure 4.1). Étant donné qu'il n'y a que très peu de récepteurs WT qui adoptent la conformation active, il est évident que les différences entre le WT et le N111W sont négligeables. Par conséquent, le photomarquage des doubles mutants méthionine/N111W n'a pas été investigué plus profondément.

Durant le photomarquage, nous avons aussi investigué la préférence distincte du Bpa pour le carbone  $\epsilon$  ou  $\gamma$  sur chaque méthionine. Nous avons pu observer un mécanisme non aléatoire probablement causé par l'orientation des chaînes latérales. Cette observation repose sur le fait qu'il n'y a pas de corrélation entre le ratio du marquage méthionine/DTMVII et le ratio du marquage  $\epsilon/\gamma$ . Les résidus qui ont été modélisés avec les contraintes de distances les plus éloignées du ligand sont les positions F77M, N200M et T260M. Ces trois positions, qui ont une accessibilité au  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Bpa<sup>8</sup>] AngII faible, ont tout de même un signal élevé de marquage  $\gamma$ .



**Figure 5.4 :** Modélisation moléculaire du résidu N111W. Il formerait des interactions Van der Waals avec les résidus 77F et 112L ainsi qu'un pont hydrogène avec le 74D.

Figure préparée par Dr. Pierre Lavigne.

La préférence du Bpa pour le carbone  $\epsilon$  ou  $\gamma$  ne serait donc pas influencée par sa proximité avec les méthionines, mais plutôt par l'orientation de la chaîne latérale de la méthionine. Étant donné qu'il n'y a pas de corrélation entre le ratio du marquage Met/TMDVII et le ratio  $\epsilon/\gamma$ , l'intensité du marquage  $\gamma$  versus  $\epsilon$  ne devrait pas être un indicateur de l'accessibilité ni de la distance.

Tel qu'expliqué auparavant, les vieux équipements (voir figure 1.14) réchauffaient les échantillons. Ceci a été confirmé en insérant l'électrode d'un thermomètre dans un pétri durant l'heure de photolyse. On a pu observer que la température peut varier de 8 à 30°C dans l'échantillon selon différents facteurs extérieurs. Nous soupçonnons que les lampes de 100W pourraient causer des dénaturations des protéines par irradiation UV et ainsi affecter le ratio de photomarquage. Il pourrait en résulter une photodénaturation due à la perte de ponts disulfure près des résidus aromatiques (Kehoe *et al.*, 2008; Neves-Petersen *et al.*, 2002). Les noyaux aromatiques irradiés risqueraient de libérer des électrons et des protons qui pourraient causer une photoréduction des cystéines (Neves-Petersen *et al.*, 2002). Dans hAT<sub>1</sub> se trouve une tyrosine en position 99 et un pont disulfure en 101. De plus, on trouve une phénylalanine en position 182 près de l'autre extrémité du même pont disulfure en position 180 (de Gasparo *et al.*, 2000). Les noyaux aromatiques, une fois irradiés, peuvent devenir chargés et nécessiteraient donc une différente solvation (variation d'ASA). Ces pertes de stabilités internes, comme la contribution de la chaleur, pourraient augmenter la fluidité structurale du récepteur et augmenter le marquage méthionine spécifique du Bpa. Par contre, les deux systèmes émettent des longueurs d'onde comparables et celles-ci ne sont pas destructives aux

protéines. Après analyse (voir section 4.3), nous constatons que les grosses lampes, à une distance plus éloignée, produisent majoritairement des longueurs d'onde dans les environs de 360-365. Il serait donc préférable de maintenir ces lampes à cette distance des échantillons dans les expériences futures. Malgré tout, les grosses lampes sont tout à fait adéquates pour une première étude de criblage à haut débit.

La variation du pH causée par la variation de la température pourrait aussi affecter la liaison des ligands sur le récepteur. Par contre, le photomarquage du même mutant à différent pH (variant de 6.8 à 8.0) ne démontrait pas de changements significatifs des ratios (voir figure 4.2). Il est évident qu'un changement extrême du pH serait très problématique pour l'interaction ligand/récepteur. Chaque résidu acide et basique pourrait perdre ou gagner une charge qui changerait la solvation de ces résidus (ASA). Néanmoins, pour chaque température de photolyse de nos études, un différent tampon fut produit pour maintenir le pH à 7.4. Tout comme la température, le pH est un facteur qui devrait être rigoureusement contrôlé.

Notre méthode nous permet d'analyser des interactions directes du complexe ligand/récepteur. Nous avons démontré que les changements conformationnels observés durant l'activation, selon les variations du ratio de marquage entre le WT et le N111G, corroborent les études cristallographiques de la rhodopsine et l'opsine (Ahuja et Smith, 2009). Par conséquent, nous pourrions de nouveau appliquer cette méthode à d'autres récepteurs et protéines. Cependant, quelques conditions sont nécessaires pour appliquer efficacement la méthode. Premièrement, nous devons être capables d'insérer une molécule photolabile à l'intérieur du ligand natif pour former un lien covalent entre le radiotracer et le récepteur. Il est également possible d'insérer le Bpa ou le Tdf comme acide aminé non-naturel qui sera traduit durant la

synthèse cellulaire du récepteur. De cette façon, le récepteur aura la possibilité de lier par photomarquage un ligand radiomarqué (Liu *et al.*, 2007; Umanah *et al.*, 2009; Xie et Schultz, 2006; Ye *et al.*, 2008) dans le cas où la modification du ligand est impossible. De plus, nous avons besoin d'un appareil de photolyse thermiquement contrôlé qui maintient les échantillons à une distance fixe et constante des lampes. Finalement, la protéine étudiée devra être digérée d'une façon reproductible pour permettre l'identification des régions de contact. D'autres mutations constitutivement actives pourraient aussi favoriser la compréhension des mécanismes d'activations. Les variations observées dans les ratios sont reliées aux mécanismes d'activations du RCPG dans la voie étudiée.

## **6. Conclusion et Perspectives**

Le photomarquage en fonction de la température a de nombreux avantages sur le photomarquage traditionnel. Nous pouvons maintenir le récepteur dans des conformations plus stables avec moins de fluctuations. Par la même occasion, le photomarquage en fonction de la température nous permet d'étudier le récepteur dans sa flexibilité conformationnelle physiologique. Les méthodes biophysiques pour analyser les RCPGs telles que la cristallographie et la diffraction au rayon X, bien qu'à très bonne résolution, ne permettent pas d'analyser les étendues de mouvements permises par ces protéines membranaires réfractaires. L'étude des récepteurs couplés

aux protéines G est encore dans son enfance et les nouvelles méthodes permettent d'approfondir les connaissances sur ces protéines physiologiquement et pharmacologiquement importantes. Toutes les études de photomarquage subséquentes devront contrôler la température de photolyse pour maintenir la reproductibilité et l'intégrité du MPA. Le rayon d'action du Bpa n'est pas fixe : il varie en fonction de la flexibilité du complexe et cette flexibilité structurale est influencée par la température. Non seulement nous pouvons recueillir de l'information structurale, mais nous pouvons aussi constater des changements conformationnels importants suite à une mutation constitutivement active. Ces changements conformationnels nous permettront potentiellement de concevoir des ligands avec une fonctionnalité voulue. L'approche rationnelle de conception de médicaments a donc besoin de tenir compte non seulement de la structure, mais aussi de l'étendue des mouvements permis par le complexe ligand/récepteur dans un contexte physiologique.

## **7. Remerciements**

J'aimerais remercier en premier mes directeurs Emanuel Escher et Pierre Lavigne qui ont contribué à ma formation de jeune chercheur. Ils ont toujours permis un milieu de travail très harmonieux et plaisant, tout en me dirigeant dans les bonnes directions quand nécessaire. De plus, ils ont permis beaucoup de latitude dans mon choix de direction à prendre pour résoudre une panoplie de questions durant ce projet

et de mes nombreuses excursions dans plusieurs domaines auxiliaires. Ceci a grandement contribué à mon indépendance et de mon ouverture d'esprit scientifique.

Je voudrais aussi remercier Marie-Reine Lefebvre pour son support scientifique astronomique et de sa contribution au bon fonctionnement du laboratoire. Je voudrais aussi remercier Brian J. Holleran, Dany Fillion, Martin Clément, Raymond jr Hamel et Antoine Désilet pour leurs aides scientifiques constants. Je tiens aussi à remercier tous les étudiants, assistants, fonctionnaires, professeurs et stagiaires du département de pharmacologie qui m'auraient aidé durant mon séjour. Ainsi que le laboratoire de biophotonique et d'optoélectronique de la faculté de génie pour l'utilisation de leur spectrophotomètre.

Je voudrais aussi remercier mes parents Suzanne et Daniel pour m'avoir élevé dans un environnement sain qui favorise le questionnement et l'apprentissage. Ainsi que tous mes amis, mes frères et les autres membres de ma famille.

Je voudrais aussi remercier Sensei Larry Foisy et Shihan Wayne Thibodeau qui ont contribué à renforcer mon corps et mon esprit qui s'est traduit dans mon travail, dans ma volonté et dans ma persévérance. Dans le même ordre d'idée, je voudrais aussi nommé les philosophes Aleister Crowley, Kevin Ogilvie, Maynard James Keenan, Albert Camus, Alejandro Jodorowsky, Lao Tzu, Friedrich Nietzsche, Sanchoniathon et Timothy Leary pour leur contribution existentielle à mon ouverture d'esprit, ma confusion constructive, mon amour et ma volonté.

## 8. Listes des Références

(NCQA), N. C. f. Q. A. "Hypertension: percentage of members 18 to 85 years of age who had a diagnosis of hypertension and whose blood pressure (BP) was adequately controlled (BP less than or equal to 140/90 mm Hg) during the measurement year

HEDIS 2008: Healthcare Effectiveness Data & Information Set 2(Technical Specifications): Various(2007).

AbdAlla, S.,Lother, H.,Abdel-tawab, A. M. et Quitterer, U. "The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist." *J Biol Chem* **276**(43): 39721-6(2001).

AbdAlla, S.,Lother, H. et Quitterer, U. "AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration." *Nature* **407**(6800): 94-8(2000).

Ahuja, S. et Smith, S. O. "Multiple switches in G protein-coupled receptor activation." *Trends Pharmacol Sci* **30**(9): 494-502(2009).

Akabas, M. H.,Stauffer, D. A.,Xu, M. et Karlin, A. "Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants." *Science* **258**(5080): 307-10(1992).

Alewijnse, A. E.,Timmerman, H.,Jacobs, E. H.,Smit, M. J.,Roovers, E.,Cotecchia, S. et Leurs, R. "The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor." *Mol Pharmacol* **57**(5): 890-8(2000).

- Ali, M. S., Sayeski, P. P., Dirksen, L. B., Hayzer, D. J., Marrero, M. B. et Bernstein, K. E. "Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor." *J Biol Chem* **272**(37): 23382-8(1997).
- Altenbach, C., Cai, K., Khorana, H. G. et Hubbell, W. L. "Structural features and light-dependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study." *Biochemistry* **38**(25): 7931-7(1999).
- Aplin, M., Christensen, G. L. et Hansen, J. L. "Pharmacologic perspectives of functional selectivity by the angiotensin II type 1 receptor." *Trends Cardiovasc Med* **18**(8): 305-12(2008).
- Arsenault, J., Lehoux, J., Lantier, L., Cabana, J., Guillemette, G., Lavigne, P., Leduc, R. et Escher, E. "A single nucleotide polymorphism of alanine to threonine at position 163 of the human angiotensin II type 1 receptor impairs Losartan affinity." *Pharmacogenetics and genomics* **20**(6): 377-388(2010).
- Association, C. P. (2005). Compendium of Pharmaceuticals and Specialties, Canadian Pharmacists Association.
- Auger-Messier, M., Arguin, G., Chaloux, B., Leduc, R., Escher, E. et Guillemette, G. "Down-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cells stably expressing the constitutively active angiotensin II N111G-AT(1) receptor." *Mol Endocrinol* **18**(12): 2967-80(2004).
- Auger-Messier, M., Clement, M., Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Leduc, R., Escher, E. et Guillemette, G. "The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II maintains a high affinity conformation despite being uncoupled

- from its cognate G protein Gq/11alpha." *Endocrinology* **144**(12): 5277-84(2003).
- Auger-Messier, M., Turgeon, E. S., Leduc, R., Escher, E. et Guillemette, G. "The constitutively active N111G-AT1 receptor for angiotensin II modifies the morphology and cytoskeletal organization of HEK-293 cells." *Exp Cell Res* **308**(1): 188-95(2005).
- Baldwin, J. M., Schertler, G. F. et Unger, V. M. "An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors." *J Mol Biol* **272**(1): 144-64(1997).
- Ballesteros, J. A., Shi, L. et Javitch, J. A. "Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors." *Mol Pharmacol* **60**(1): 1-19(2001).
- Ballesteros, J. A. et Weinstein, H. "Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein coupled receptors." *Meth. Neurosci.* **25**: 366-428(1995).
- Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M. et Rockman, H. A. "Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo." *Circulation* **108**(13): 1611-8(2003).
- Bhattacharya, S., Hall, S. E. et Vaidehi, N. "Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors." *J Mol Biol* **382**(2): 539-55(2008).
- Black, J. W. et Leff, P. "Operational models of pharmacological agonism." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **220**(1219): 141-62(1983).

- Booz, G. W., Day, J. N. et Baker, K. M. "Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure." *J Mol Cell Cardiol* **34**(11): 1443-53(2002).
- Bosse, R., Servant, G., Zhou, L. M., Boulay, G., Guillemette, G. et Escher, E. "Sar1-p-benzoylphenylalanine-angiotensin, a new photoaffinity probe for selective labeling of the type 2 angiotensin receptor." *Regul Pept* **44**(2): 215-23(1993).
- Bosshard, H. R. "Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept?" *News Physiol Sci* **16**: 171-3(2001).
- Boucard, A. A., Roy, M., Beaulieu, M. E., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. "Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket." *J Biol Chem* **278**(38): 36628-36(2003).
- Boucard, A. A., Wilkes, B. C., Laporte, S. A., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. "Photolabeling identifies position 172 of the human AT(1) receptor as a ligand contact point: receptor-bound angiotensin II adopts an extended structure." *Biochemistry* **39**(32): 9662-70(2000).
- Breton, C., Chellil, H., Kabbaj-Benmansour, M., Carnazzi, E., Seyer, R., Phalipou, S., Morin, D., Durroux, T., Zingg, H., Barberis, C. et Mouillac, B. "Direct identification of human oxytocin receptor-binding domains using a photoactivatable cyclic peptide antagonist: comparison with the human V1a vasopressin receptor." *J Biol Chem* **276**(29): 26931-41(2001).

- Bryant, J. W. et Shariat-Madar, Z. "Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters." *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **7**(3): 234-50(2009).
- Cappelli, A.,Nannicini, C.,Gallelli, A.,Giuliani, G.,Valenti, S.,Mohr, G. P.,Anzini, M.,Mennuni, L.,Ferrari, F.,Caselli, G.,Giordani, A.,Peris, W.,Makovec, F.,Giorgi, G. et Vomero, S. "Design, synthesis, and biological evaluation of AT1 angiotensin II receptor antagonists based on the pyrazolo[3,4-b]pyridine and related heteroaromatic bicyclic systems." *J Med Chem* **51**(7): 2137-46(2008).
- Carlsson, P. O.,Berne, C. et Jansson, L. "Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats." *Diabetologia* **41**(2): 127-33(1998).
- Chaki, S. et Inagami, T. "Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro-2A cells." *Biochem Biophys Res Commun* **182**(1): 388-94(1992).
- Charest, G. et Lavigne, P. "Simple and versatile restraints for the accurate modeling of alpha-helical coiled-coil structures of multiple strandedness, orientation and composition." *Biopolymers* **81**(3): 202-14(2006).
- Cherezov, V.,Rosenbaum, D. M.,Hanson, M. A.,Rasmussen, S. G.,Thian, F. S.,Kobilka, T. S.,Choi, H. J.,Kuhn, P.,Weis, W. I.,Kobilka, B. K. et Stevens, R. C. "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." *Science* **318**(5854): 1258-65(2007).
- Chiu, A. T.,McCall, D. E.,Nguyen, T. T.,Carini, D. J.,Duncia, J. V.,Herblin, W. F.,Uyeda, R. T.,Wong, P. C.,Wexler, R. R.,Johnson, A. L. et et al.

- "Discrimination of angiotensin II receptor subtypes by dithiothreitol." *Eur J Pharmacol* **170**(1-2): 117-8(1989).
- Christopoulos, A. et Kenakin, T. "G protein-coupled receptor allosterism and complexing." *Pharmacol Rev* **54**(2): 323-74(2002).
- Ciruela, F. "Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells." *Curr Opin Biotechnol* **19**(4): 338-43(2008).
- Clement, M.,Cabana, J.,Holleran, B. J.,Leduc, R.,Guillemette, G.,Lavigne, P. et Escher, E. "Activation induces structural changes in the liganded angiotensin II type 1 receptor." *J Biol Chem* **284**(39): 26603-12(2009).
- Clement, M.,Chamberland, C.,Perodin, J.,Leduc, R.,Guillemette, G. et Escher, E. "The active and the inactive form of the hAT1 receptor have an identical ligand-binding environment: an MPA study on a constitutively active angiotensin II receptor mutant." *J Recept Signal Transduct Res* **26**(5-6): 417-33(2006).
- Clement, M.,Martin, S. S.,Beaulieu, M. E.,Chamberland, C.,Lavigne, P.,Leduc, R.,Guillemette, G. et Escher, E. "Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay." *J Biol Chem* **280**(29): 27121-9(2005).
- Corpet, F. "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." *Nucleic Acids Res* **16**(22): 10881-90(1988).
- Costanzi, S. "On the applicability of GPCR homology models to computer-aided drug discovery: a comparison between in silico and crystal structures of the beta2-adrenergic receptor." *J Med Chem* **51**(10): 2907-14(2008).

- Cozzini, P., Kellogg, G. E., Spyarakis, F., Abraham, D. J., Costantino, G., Emerson, A., Fanelli, F., Gohlke, H., Kuhn, L. A., Morris, G. M., Orozco, M., Pertinhez, T. A., Rizzi, M. et Sottriffer, C. A. "Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design." *J Med Chem* **51**(20): 6237-55(2008).
- Crimmins, D. L., Mische, S. M. et Denslow, N. D. "Chemical cleavage of proteins on membranes." *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 11**: Unit 11 5(2001).
- Cuerrier, C. M., Benoit, M., Guillemette, G., Gobeil, F., Jr. et Grandbois, M. "Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy." *Pflugers Arch* **457**(6): 1361-72(2009).
- Curnow, K. M., Pascoe, L., Davies, E., White, P. C., Corvol, P. et Clauser, E. "Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms." *Mol Endocrinol* **9**(9): 1250-62(1995).
- Curnow, K. M., Pascoe, L. et White, P. C. "Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor." *Mol Endocrinol* **6**(7): 1113-8(1992).
- Day, P. W., Rasmussen, S. G., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X. J., Choi, H. J., Weis, W. I., Rohrer, D. K. et Kobilka, B. K. "A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography." *Nat Methods* **4**(11): 927-9(2007).
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W. et Unger, T. "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." *Pharmacol Rev* **52**(3): 415-72(2000).

- de Gasparo, M., Whitebread, S., Kalenga, M. K., de Hertogh, R., Crevoisier, P. et Thomas, K. "Down regulation of the angiotensin II receptor subtype AT2 in human myometrium during pregnancy." *Regul Pept* **53**(1): 39-45(1994).
- de Graaf, C., Foata, N., Engkvist, O. et Rognan, D. "Molecular modeling of the second extracellular loop of G-protein coupled receptors and its implication on structure-based virtual screening." *Proteins* **71**(2): 599-620(2008).
- Deraet, M., Rihakova, L., Boucard, A., Perodin, J., Sauve, S., Mathieu, A. P., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. "Angiotensin II is bound to both receptors AT1 and AT2, parallel to the transmembrane domains and in an extended form." *Can J Physiol Pharmacol* **80**(5): 418-25(2002).
- Doan, T. N., Ali, M. S. et Bernstein, K. E. "Tyrosine kinase activation by the angiotensin II receptor in the absence of calcium signaling." *J Biol Chem* **276**(24): 20954-8(2001).
- Domazet, I., Holleran, B. J., Martin, S. S., Lavigne, P., Leduc, R., Escher, E. et Guillemette, G. "The second transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor participates in the formation of the ligand binding pocket and undergoes integral pivoting movement during the process of receptor activation." *J Biol Chem* **284**(18): 11922-9(2009).
- Domazet, I., Martin, S. S., Holleran, B. J., Morin, M. E., Lacasse, P., Lavigne, P., Escher, E., Leduc, R. et Guillemette, G. "The fifth transmembrane domain of angiotensin II Type 1 receptor participates in the formation of the ligand-binding pocket and undergoes a counterclockwise rotation upon receptor activation." *J Biol Chem* **284**(46): 31953-61(2009).

- Dong, M. et Miller, L. J. "Effects of pH and temperature on photoaffinity labeling of Family B G protein-coupled receptors." *Regul Pept*(2009).
- Du, J., Sperling, L. S., Marrero, M. B., Phillips, L. et Delafontaine, P. "G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor 1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **218**(3): 934-9(1996).
- Elling, C. E., Thirstrup, K., Holst, B. et Schwartz, T. W. "Conversion of agonist site to metal-ion chelator site in the beta(2)-adrenergic receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12322-7(1999).
- Elton, T. S. et Martin, M. M. "Alternative splicing: a novel mechanism to fine-tune the expression and function of the human AT1 receptor." *Trends Endocrinol Metab* **14**(2): 66-71(2003).
- Feng, Y. H., Miura, S., Husain, A. et Karnik, S. S. "Mechanism of constitutive activation of the AT1 receptor: influence of the size of the agonist switch binding residue Asn(111)." *Biochemistry* **37**(45): 15791-8(1998).
- Fierens, F. L., Vanderheyden, P. M., De Backer, J. P. et Vauquelin, G. "Insurmountable angiotensin AT1 receptor antagonists: the role of tight antagonist binding." *Eur J Pharmacol* **372**(2): 199-206(1999).
- Fillion, D., Deraet, M., Holleran, B. J. et Escher, E. "Stereospecific synthesis of a carbene-generating angiotensin II analogue for comparative photoaffinity labeling: improved incorporation and absence of methionine selectivity." *J Med Chem* **49**(7): 2200-9(2006).

- Fillion, D., Lemieux, G., Basambombo, L. L., Lavigne, P., Guillemette, G., Leduc, R. et Escher, E. "The Amino-Terminus of Angiotensin II Contacts Several Ectodomains of the Angiotensin II Receptor AT(1)." *J Med Chem*(2010).
- Fleming, I., Kohlstedt, K. et Busse, R. "The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**(1): 8-13(2006).
- Flower, D. R. "Modelling G-protein-coupled receptors for drug design." *Biochim Biophys Acta* **1422**(3): 207-34(1999).
- Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M. et Harmar, A. J. "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-88(2005).
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. et Schiöth, H. B. "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-72(2003).
- Freire, E. "Structural thermodynamics: prediction of protein stability and protein binding affinities." *Arch Biochem Biophys* **303**(2): 181-4(1993).
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K. P. et Ernst, O. P. "Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2290-5(2003).
- Fung, J. J., Deupi, X., Pardo, L., Yao, X. J., Velez-Ruiz, G. A., Devree, B. T., Sunahara, R. K. et Kobilka, B. K. "Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer." *Embo J* **28**(21): 3315-28(2009).
- Fyhrquist, F. et Saijonmaa, O. "Renin-angiotensin system revisited." *J Intern Med* **264**(3): 224-36(2008).

- Gagnon, T.,Fillion, D.,Lefebvre, M. R. et Escher, E. "Synthesis of an agonistic, difluoro-azido photolabel of angiotensin II and labeling of the AT1 receptor: transmembrane domains 3, 6, and 7 form the ligand-binding pocket." *J Recept Signal Transduct Res* **26**(5-6): 435-51(2006).
- Galvez, T.,Duthey, B.,Kniazeff, J.,Blahos, J.,Rovelli, G.,Bettler, B.,Prezeau, L. et Pin, J. P. "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." *Embo J* **20**(9): 2152-9(2001).
- Gether, U. "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* **21**(1): 90-113(2000).
- Gether, U. et Kobilka, B. K. "G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation." *J Biol Chem* **273**(29): 17979-82(1998).
- Gether, U.,Lin, S.,Ghanouni, P.,Ballesteros, J. A.,Weinstein, H. et Kobilka, B. K. "Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor." *Embo J* **16**(22): 6737-47(1997).
- Gosselin, M. J.,Leclerc, P. C.,Auger-Messier, M.,Guillemette, G.,Escher, E. et Leduc, R. "Molecular cloning of a ferret angiotensin II AT(1) receptor reveals the importance of position 163 for Losartan binding." *Biochim Biophys Acta* **1497**(1): 94-102(2000).
- Gradman, A. H.,Schmieder, R. E.,Lins, R. L.,Nussberger, J.,Chiang, Y. et Bedigian, M. P. "Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients." *Circulation* **111**(8): 1012-8(2005).

- Guerrini, R.,Salvadori, S.,Rizzi, A.,Regoli, D. et Calo, G. "Neurobiology, pharmacology, and medicinal chemistry of neuropeptide S and its receptor." *Med Res Rev*(2009).
- Hall, M. M.,Khosla, M. C.,Khairallah, P. A. et Bumpus, F. M. "Angiotensin analogs: the influence of sarcosine substituted in position 1." *J Pharmacol Exp Ther* **188**(1): 222-8(1974).
- Harrison, C. et Traynor, J. R. "The [35S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology." *Life Sci* **74**(4): 489-508(2003).
- Hein, L.,Barsh, G. S.,Pratt, R. E.,Dzau, V. J. et Kobilka, B. K. "Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice." *Nature* **377**(6551): 744-7(1995).
- Hesse, L.,Erdmann, G.,Eschenhagen, T. et Wellhoner, H. H. "Improved method for autoradiographic localization of beta-adrenoceptors using photoaffinity labelling." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **347**(5): 494-9(1993).
- Holleran, B. J.,Beaulieu, M. E.,Proulx, C. D.,Lavigne, P.,Escher, E. et Leduc, R. "Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites." *Biochem J* **402**(1): 51-61(2007).
- Holleran, B. J.,Domazet, I.,Beaulieu, M. E.,Yan, L. P.,Guillemette, G.,Lavigne, P.,Escher, E. et Leduc, R. "Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor." *Biochem Pharmacol* **77**(8): 1374-82(2009).
- Hunyady, L. "Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization." *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S47-56(1999).

- Hunyady, L. et Catt, K. J. "Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II." *Mol Endocrinol* **20**(5): 953-70(2006).
- Hunyady, L., Ji, H., Jagadeesh, G., Zhang, M., Gaborik, Z., Mihalik, B. et Catt, K. J. "Dependence of AT1 angiotensin receptor function on adjacent asparagine residues in the seventh transmembrane helix." *Mol Pharmacol* **54**(2): 427-34(1998).
- Inoue, Y., Nakamura, N. et Inagami, T. "A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism." *J Hypertens* **15**(7): 703-14(1997).
- Ismail, M. A., Barker, S., Abou el-Ella, D. A., Abouzid, K. A., Toubar, R. A. et Todd, M. H. "Design and synthesis of new tetrazolyl- and carboxy-biphenylmethyl-quinazolin-4-one derivatives as angiotensin II AT1 receptor antagonists." *J Med Chem* **49**(5): 1526-35(2006).
- Israili, Z. H. "Clinical pharmacokinetics of angiotensin II (AT1) receptor blockers in hypertension." *J Hum Hypertens* **14 Suppl 1**: S73-86(2000).
- Jain, G., Campbell, R. C. et Warnock, D. G. "Mineralocorticoid receptor blockers and chronic kidney disease." *Clin J Am Soc Nephrol* **4**(10): 1685-91(2009).
- Javitch, J. A., Ballesteros, J. A., Weinstein, H. et Chen, J. "A cluster of aromatic residues in the sixth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor is accessible in the binding-site crevice." *Biochemistry* **37**(4): 998-1006(1998).

- Javitch, J. A.,Fu, D.,Chen, J. et Karlin, A. "Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method." *Neuron* **14**(4): 825-31(1995).
- Ji, H.,Leung, M.,Zhang, Y.,Catt, K. J. et Sandberg, K. "Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT1 angiotensin receptor. Identification of amino acid residues that determine binding of the antihypertensive drug losartan." *J Biol Chem* **269**(24): 16533-6(1994).
- Jiang, M. et Bajpayee, N. S. "Molecular mechanisms of go signaling." *Neurosignals* **17**(1): 23-41(2009).
- Jongejan, A.,Bruysters, M.,Ballesteros, J. A.,Haaksma, E.,Bakker, R. A.,Pardo, L. et Leurs, R. "Linking agonist binding to histamine H1 receptor activation." *Nat Chem Biol* **1**(2): 98-103(2005).
- Joseph, M. P.,Maigret, B.,Bonnafous, J. C.,Marie, J. et Scheraga, H. A. "A computer modeling postulated mechanism for angiotensin II receptor activation." *J Protein Chem* **14**(5): 381-98(1995).
- Kageyama, R.,Ohkubo, H. et Nakanishi, S. "Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence." *Biochemistry* **23**(16): 3603-9(1984).
- Karamyan, V. T. et Speth, R. C. "Distribution of the Non-AT1, Non-AT2 Angiotensin-Binding Site in the Rat Brain: Preliminary Characterization." *Neuroendocrinology* **88**(4): 256-265(2008).

- Karamyan, V. T., Stockmeier, C. A. et Speth, R. C. "Human brain contains a novel non-AT1, non-AT2 binding site for active angiotensin peptides." *Life Sci* **83**(11-12): 421-5(2008).
- Kawamura, A., Hindi, S., Mihai, D. M., James, L. et Aminova, O. "Binding is not enough: flexibility is needed for photocrosslinking of Lck kinase by benzophenone photoligands." *Bioorg Med Chem* **16**(19): 8824-9(2008).
- Kehoe, J. J., Remondetto, G. E., Subirade, M., Morris, E. R. et Brodkorb, A. "Tryptophan-mediated denaturation of beta-lactoglobulin A by UV irradiation." *J Agric Food Chem* **56**(12): 4720-5(2008).
- Kenakin, T. "Agonist-specific receptor conformations." *Trends Pharmacol Sci* **18**(11): 416-7(1997).
- Kenakin, T. "Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation." *Faseb J* **15**(3): 598-611(2001).
- Kenakin, T. "Drug efficacy at G protein-coupled receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 349-79(2002).
- Kenakin, T. "Principles: receptor theory in pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* **25**(4): 186-92(2004).
- Kenakin, T. "Allosteric Theory: Taking Therapeutic Advantage of the Malleable Nature of GPCRs." *Curr Neuropharmacol* **5**(3): 149-56(2007).
- Kenakin, T. "Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship?" *Mol Pharmacol* **72**(6): 1393-401(2007).
- Kenakin, T. et Miller, L. J. "Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery." *Pharmacol Rev* **62**(2): 265-304(2010).

- Khosla, M. C., Hall, M. M., Smeby, R. R. et Bumpus, F. M. "Agonist and antagonist relationships in 1- and 8-substituted analogs of angiotensin II." *J Med Chem* **17**(11): 1156-60(1974).
- Kobilka, B. et Schertler, G. F. "New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations." *Trends Pharmacol Sci* **29**(2): 79-83(2008).
- Kobilka, B. K. et Deupi, X. "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors." *Trends Pharmacol Sci* **28**(8): 397-406(2007).
- Koike, G., Horiuchi, M., Yamada, T., Szpirer, C., Jacob, H. J. et Dzau, V. J. "Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung." *Biochem Biophys Res Commun* **203**(3): 1842-50(1994).
- Kopin, A. S., McBride, E. W., Schaffer, K. et Beinborn, M. "CCK receptor polymorphisms: an illustration of emerging themes in pharmacogenomics." *Trends Pharmacol Sci* **21**(9): 346-53(2000).
- Kostenis, E., Milligan, G., Christopoulos, A., Sanchez-Ferrer, C. F., Heringer-Walther, S., Sexton, P. M., Gembardt, F., Kellett, E., Martini, L., Vanderheyden, P., Schultheiss, H. P. et Walther, T. "G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor." *Circulation* **111**(14): 1806-13(2005).
- Kranzhofer, R., Browatzki, M., Schmidt, J. et Kubler, W. "Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(3): 826-8(1999).
- Kuroda, Y., Yukinaga, H., Kitano, M., Noguchi, T., Nemati, M., Shibukawa, A., Nakagawa, T. et Matsuzaki, K. "On-line capillary isoelectric focusing-mass

- spectrometry for quantitative analysis of peptides and proteins." *J Pharm Biomed Anal* **37**(3): 423-8(2005).
- Kuszak, A. J., Pitchaiya, S., Anand, J. P., Mosberg, H. I., Walter, N. G. et Sunahara, R. K. "Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2." *J Biol Chem* **284**(39): 26732-41(2009).
- Lagerstrom, M. C., Klovins, J., Fredriksson, R., Fridmanis, D., Haitina, T., Ling, M. K., Berglund, M. M. et Schioth, H. B. "High affinity agonistic metal ion binding sites within the melanocortin 4 receptor illustrate conformational change of transmembrane region 3." *J Biol Chem* **278**(51): 51521-6(2003).
- Lancot, P. M., Leclerc, P. C., Clement, M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R. et Guillemette, G. "Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor." *Biochem J* **390**(Pt 1): 367-76(2005).
- Lancot, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Leduc, R. et Guillemette, G. "Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor." *Biochemistry* **38**(27): 8621-7(1999).
- Laporte, S. A., Boucard, A. A., Servant, G., Guillemette, G., Leduc, R. et Escher, E. "Determination of peptide contact points in the human angiotensin II type I receptor (AT1) with photosensitive analogs of angiotensin II." *Mol Endocrinol* **13**(4): 578-86(1999).
- Latronico, A. C., Abell, A. N., Arnhold, I. J., Liu, X., Lins, T. S., Brito, V. N., Billerbeck, A. E., Segaloff, D. L. et Mendonca, B. B. "A unique constitutively activating mutation in third transmembrane helix of luteinizing hormone receptor causes

- sporadic male gonadotropin-independent precocious puberty." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(7): 2435-40(1998).
- Le, M. T.,Vanderheyden, P. M.,Szaszak, M.,Hunyady, L. et Vauquelin, G. "Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT1 receptors. Distinct roles of the N-and C-terminal residues of angiotensin II during AT1 receptor activation." *J Biol Chem* **277**(26): 23107-10(2002).
- Leclerc, P. C.,Auger-Messier, M.,Lanctot, P. M.,Escher, E.,Leduc, R. et Guillemette, G. "A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling." *Endocrinology* **143**(12): 4702-10(2002).
- Leclerc, P. C.,Lanctot, P. M.,Auger-Messier, M.,Escher, E.,Leduc, R. et Guillemette, G. "S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II." *Br J Pharmacol* **148**(3): 306-13(2006).
- Leclerc, P. C.,Proulx, C. D.,Arguin, G.,Belanger, S.,Gobeil, F., Jr.,Escher, E.,Leduc, R. et Guillemette, G. "Ascorbic acid decreases the binding affinity of the AT1 receptor for angiotensin II." *Am J Hypertens* **21**(1): 67-71(2008).
- Li, L.,Dantzer, J. J.,Nowacki, J.,O'Callaghan, B. J. et Meroueh, S. O. "PDBcal: a comprehensive dataset for receptor-ligand interactions with three-dimensional structures and binding thermodynamics from isothermal titration calorimetry." *Chem Biol Drug Des* **71**(6): 529-32(2008).
- Linderman, J. J. "Modeling of G-protein coupled receptor signaling pathways." *J Biol Chem*(2008).

- Liu, W., Brock, A., Chen, S., Chen, S. et Schultz, P. G. "Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells." *Nat Methods* **4**(3): 239-44(2007).
- Luchtefeld, M., Drexler, H. et Schieffer, B. "Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3): 756-60(2001).
- Marciniak, B., Bobrowski, K. et Hug, G. L. "Quenching of triplet states of aromatic ketones by sulfur-containing amino acids in solution. Evidence for electron transfer." *J. Phys. Chem.* **97**: 11937-11943(1993).
- Martin, S. S., Boucard, A. A., Clement, M., Escher, E., Leduc, R. et Guillemette, G. "Analysis of the third transmembrane domain of the human type 1 angiotensin II receptor by cysteine scanning mutagenesis." *J Biol Chem* **279**(49): 51415-23(2004).
- Martin, S. S., Holleran, B. J., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. "Activation of the angiotensin II type 1 receptor leads to movement of the sixth transmembrane domain: analysis by the substituted cysteine accessibility method." *Mol Pharmacol* **72**(1): 182-90(2007).
- Maturana, A. D., Casal, A. J., Demaurex, N., Vallotton, M. B., Capponi, A. M. et Rossier, M. F. "Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells." *J Biol Chem* **274**(28): 19943-8(1999).
- Mehler, E. L., Periole, X., Hassan, S. A. et Weinstein, H. "Key issues in the computational simulation of GPCR function: representation of loop domains." *J Comput Aided Mol Des* **16**(11): 841-53(2002).

- Milligan, G. "G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology." *Mol Pharmacol* **66**(1): 1-7(2004).
- Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S. et Palczewski, K. "Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin." *Biochemistry* **42**(10): 2759-67(2003).
- Miura, S., Feng, Y. H., Husain, A. et Karnik, S. S. "Role of aromaticity of agonist switches of angiotensin II in the activation of the AT1 receptor." *J Biol Chem* **274**(11): 7103-10(1999).
- Miura, S., Saku, K. et Karnik, S. S. "Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor." *Hypertens Res* **26**(12): 937-43(2003).
- Mizuno, N. et Itoh, H. "Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways." *Neurosignals* **17**(1): 42-54(2009).
- Moore, C. A., Milano, S. K. et Benovic, J. L. "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." *Annu Rev Physiol* **69**: 451-82(2007).
- Mukoyama, M., Nakajima, M., Horiuchi, M., Sasamura, H., Pratt, R. E. et Dzau, V. J. "Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors." *J Biol Chem* **268**(33): 24539-42(1993).
- Munson, M., Balasubramanian, S., Fleming, K. G., Nagi, A. D., O'Brien, R., Sturtevant, J. M. et Regan, L. "What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties." *Protein Sci* **5**(8): 1584-93(1996).
- Murphy, K. P. "Predicting binding energetics from structure: looking beyond DeltaG degrees." *Med Res Rev* **19**(4): 333-9(1999).

- Murphy, K. P., Xie, D., Thompson, K. S., Amzel, L. M. et Freire, E. "Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss." *Proteins* **18**(1): 63-7(1994).
- Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. et Bernstein, K. E. "Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor." *Nature* **351**(6323): 233-6(1991).
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. et Christopoulos, A. "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology." *Pharmacol Rev* **55**(4): 597-606(2003).
- Neves-Petersen, M. T., Gryczynski, Z., Lakowicz, J., Fojan, P., Pedersen, S., Petersen, E. et Bjorn Petersen, S. "High probability of disrupting a disulphide bridge mediated by an endogenous excited tryptophan residue." *Protein Sci* **11**(3): 588-600(2002).
- Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzhir, L., Giller, T. et Sraer, J. D. "Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin." *J Clin Invest* **109**(11): 1417-27(2002).
- Nikiforovich, G. V., Kao, J. L., Plucinska, K., Zhang, W. J. et Marshall, G. R. "Conformational analysis of two cyclic analogs of angiotensin: implications for the biologically active conformation." *Biochemistry* **33**(12): 3591-8(1994).
- Nikiforovich, G. V. et Marshall, G. R. "Three-dimensional recognition requirements for angiotensin agonists: a novel solution for an old problem." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 222-8(1993).

- Nikiforovich, G. V.,Mihalik, B.,Catt, K. J. et Marshall, G. R. "Molecular mechanisms of constitutive activity: mutations at position 111 of the angiotensin AT1 receptor." *J Pept Res* **66**(5): 236-48(2005).
- Nikiforovich, G. V.,Zhang, M.,Yang, Q.,Jagadeesh, G.,Chen, H. C.,Hunyady, L.,Marshall, G. R. et Catt, K. J. "Interactions between conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 during angiotensin AT1 receptor activation." *Chem Biol Drug Des* **68**(5): 239-49(2006).
- Noda, K.,Saad, Y.,Kinoshita, A.,Boyle, T. P.,Graham, R. M.,Husain, A. et Karnik, S. S. "Tetrazole and carboxylate groups of angiotensin receptor antagonists bind to the same subsite by different mechanisms." *J Biol Chem* **270**(5): 2284-9(1995).
- Okada, T.,Sugihara, M.,Bondar, A. N.,Elstner, M.,Entel, P. et Buss, V. "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure." *J Mol Biol* **342**(2): 571-83(2004).
- Oldham, W. M. et Hamm, H. E. "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 60-71(2008).
- Oliveira, L.,Costa-Neto, C. M.,Nakaie, C. R.,Schreier, S.,Shimuta, S. I. et Paiva, A. C. "The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure." *Physiol Rev* **87**(2): 565-92(2007).
- Oro, C.,Qian, H. et Thomas, W. G. "Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins." *Pharmacol Ther* **113**(1): 210-26(2007).
- Palczewski, K.,Kumasaka, T.,Hori, T.,Behnke, C. A.,Motoshima, H.,Fox, B. A.,Le Trong, I.,Teller, D. C.,Okada, T.,Stenkamp, R. E.,Yamamoto, M. et Miyano,

- M. "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-45(2000).
- Pardo, L.,Deupi, X.,Dolker, N.,Lopez-Rodriguez, M. L. et Campillo, M. "The role of internal water molecules in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors." *Chembiochem* **8**(1): 19-24(2007).
- Park, J. H.,Scheerer, P.,Hofmann, K. P.,Choe, H. W. et Ernst, O. P. "Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin." *Nature* **454**(7201): 183-7(2008).
- Parnot, C.,Bardin, S.,Miserey-Lenkei, S.,Guedin, D.,Corvol, P. et Clauser, E. "Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II type 1A receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7615-20(2000).
- Patny, A.,Desai, P. V. et Avery, M. A. "Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design." *Curr Med Chem* **13**(14): 1667-91(2006).
- Peng, H.,Carretero, O. A.,Vuljaj, N.,Liao, T. D.,Motivala, A.,Peterson, E. L. et Rhaleb, N. E. "Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action." *Circulation* **112**(16): 2436-45(2005).
- Percherancier, Y.,Berchiche, Y. A.,Slight, I.,Volkmer-Engert, R.,Tamamura, H.,Fujii, N.,Bouvier, M. et Heveker, N. "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." *J Biol Chem* **280**(11): 9895-903(2005).

- Perodin, J.,Deraet, M.,Auger-Messier, M.,Boucard, A. A.,Rihakova, L.,Beaulieu, M. E.,Lavigne, P.,Parent, J. L.,Guillemette, G.,Leduc, R. et Escher, E. "Residues 293 and 294 are ligand contact points of the human angiotensin type 1 receptor." *Biochemistry* **41**(48): 14348-56(2002).
- Perozzo, R.,Folkers, G. et Scapozza, L. "Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects." *J Recept Signal Transduct Res* **24**(1-2): 1-52(2004).
- Pham, D.,Laporte, S.,Perodin, J.,Bourgeois, R. et Escher, E. "What can angiotensin antagonists do that converting-enzyme inhibition can't: the case of post-angioplastic restenosis." *Can J Physiol Pharmacol* **74**(7): 867-77(1996).
- Phillips, M. I. et de Oliveira, E. M. "Brain renin angiotensin in disease." *J Mol Med* **86**(6): 715-22(2008).
- Pin, J. P.,Neubig, R.,Bouvier, M.,Devi, L.,Filizola, M.,Javitch, J. A.,Lohse, M. J.,Milligan, G.,Palczewski, K.,Parmentier, M. et Spedding, M. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers." *Pharmacol Rev* **59**(1): 5-13(2007).
- Pineyro, G. "Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling." *Cell Signal* **21**(2): 179-85(2009).
- Prossnitz, E. R. "Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors." *Life Sci* **75**(8): 893-9(2004).
- Putney, J. W. "Capacitative calcium entry: from concept to molecules." *Immunol Rev* **231**(1): 10-22(2009).

- Qian, H., Pipolo, L. et Thomas, W. G. "Association of beta-Arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization." *Mol Endocrinol* **15**(10): 1706-19(2001).
- Rahuel, J., Rasetti, V., Maibaum, J., Rueger, H., Goschke, R., Cohen, N. C., Stutz, S., Cumin, F., Fuhrer, W., Wood, J. M. et Grutter, M. G. "Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin." *Chem Biol* **7**(7): 493-504(2000).
- Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J. et Rockman, H. A. "When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors." *J Clin Invest* **115**(11): 2971-4(2005).
- Rao, V. R., Cohen, G. B. et Oprian, D. D. "Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness." *Nature* **367**(6464): 639-42(1994).
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I. et Kobilka, B. K. "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **450**(7168): 383-7(2007).
- Ratnala, V. R. "New tools for G-protein coupled receptor (GPCR) drug discovery: combination of baculoviral expression system and solid state NMR." *Biotechnol Lett* **28**(11): 767-78(2006).
- Rihakova, L., Deraet, M., Auger-Messier, M., Perodin, J., Boucard, A. A., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. "Methionine proximity assay, a novel method for exploring peptide ligand-receptor interaction." *J Recept Signal Transduct Res* **22**(1-4): 297-313(2002).

- Rovati, G. E., Capra, V. et Neubig, R. R. "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." *Mol Pharmacol* **71**(4): 959-64(2007).
- Ruoho, A. E., Kiefer, H., Roeder, P. E. et Singer, S. J. "The mechanism of photoaffinity labeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(9): 2567-71(1973).
- Russ, A. P. et Lampel, S. "The druggable genome: an update." *Drug Discov Today* **10**(23-24): 1607-10(2005).
- Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J. A. et Palczewski, K. "Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16123-8(2006).
- Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. et Inagami, T. "Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor." *Nature* **351**(6323): 230-3(1991).
- Saviano, M., Improta, R., Benedetti, E., Carrozzini, B., Cascarano, G. L., Didierjean, C., Toniolo, C. et Crisma, M. "Benzophenone photophore flexibility and proximity: molecular and crystal-state structure of a Bpa-containing trichogin dodecapeptide analogue." *Chembiochem* **5**(4): 541-4(2004).
- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W., Hofmann, K. P. et Ernst, O. P. "Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation." *Nature* **455**(7212): 497-502(2008).

- Schiffrin, E. L. et Touyz, R. M. "From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(2): H435-46(2004).
- Schlyer, S. et Horuk, R. "I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development." *Drug Discov Today* **11**(11-12): 481-93(2006).
- Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P. et Schmidt, B. M. "Renin-angiotensin system and cardiovascular risk." *Lancet* **369**(9568): 1208-19(2007).
- Schulte, G. et Levy, F. O. "Novel aspects of G-protein-coupled receptor signalling--different ways to achieve specificity." *Acta Physiol (Oxf)* **190**(1): 33-8(2007).
- Seifert, R. et Wenzel-Seifert, K. "Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**(5): 381-416(2002).
- Shah, B. H., Yesilkaya, A., Olivares-Reyes, J. A., Chen, H. D., Hunyady, L. et Catt, K. J. "Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor." *Mol Endocrinol* **18**(8): 2035-48(2004).
- Shi, L., Liapakis, G., Xu, R., Guarnieri, F., Ballesteros, J. A. et Javitch, J. A. "Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch." *J Biol Chem* **277**(43): 40989-96(2002).
- Shichida, Y. et Morizumi, T. "Mechanism of G-protein activation by rhodopsin." *Photochem Photobiol* **83**(1): 70-5(2007).
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. et Gautam, N. "Diversity of G proteins in signal transduction." *Science* **252**(5007): 802-8(1991).

- Souto, M. L., Borhan, B. et Nakanishi, K. "Low-temperature photoaffinity labeling of rhodopsin and intermediates along transduction path." *Methods Enzymol* **316**: 425-35(2000).
- Speth, R. C. et Karamyan, V. T. "The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain." *Heart Fail Rev* **13**(3): 299-309(2008).
- Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S. et McKnight, A. J. "LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors." *Trends Biochem Sci* **25**(6): 284-9(2000).
- Suzuki, H., Kimura, K., Shirai, H., Eguchi, K., Higuchi, S., Hinoki, A., Ishimaru, K., Brailoiu, E., Dhanasekaran, D. N., Stemmler, L. N., Fields, T. A., Frank, G. D., Autieri, M. V. et Eguchi, S. "Endothelial nitric oxide synthase inhibits G12/13 and rho-kinase activated by the angiotensin II type-1 receptor: implication in vascular migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(2): 217-24(2009).
- Suzuki, N., Hajicek, N. et Kozasa, T. "Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways." *Neurosignals* **17**(1): 55-70(2009).
- Szwajkajzer, D. et Carey, J. "Molecular and biological constraints on ligand-binding affinity and specificity." *Biopolymers* **44**(2): 181-98(1997).
- Thomas, W. G., Pipolo, L. et Qian, H. "Identification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-binding domain within the carboxyl-terminus of the angiotensin II (AT1A) receptor." *FEBS Lett* **455**(3): 367-71(1999).
- Thomas, W. G. et Qian, H. "Arresting angiotensin type 1 receptors." *Trends Endocrinol Metab* **14**(3): 130-6(2003).

- Timmermans, P. B. "Pharmacological properties of angiotensin II receptor antagonists." *Can J Cardiol* **15 Suppl F**: 26F-8F(1999).
- Tobin, A. B.,Butcher, A. J. et Kong, K. C. "Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling." *Trends Pharmacol Sci* **29**(8): 413-20(2008).
- Tousignant, C.,Guillemette, G.,Drapeau, G. et Regoli, D. "Comparison of binding assay and biological activity on a NK-1 system with new selective agonists." *Neuropeptides* **14**(4): 275-83(1989).
- Tuccinardi, T.,Calderone, V.,Rapposelli, S. et Martinelli, A. "Proposal of a new binding orientation for non-peptide AT1 antagonists: homology modeling, docking and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis." *J Med Chem* **49**(14): 4305-16(2006).
- Umanah, G.,Huang, L. Y.,Schultz, P. G.,Naider, F. et Becker, J. M. "Incorporation of the unnatural amino acid p-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) into a G protein-coupled receptor in its native context." *Adv Exp Med Biol* **611**: 333-5(2009).
- Urban, J. D.,Clarke, W. P.,von Zastrow, M.,Nichols, D. E.,Kobilka, B.,Weinstein, H.,Javitch, J. A.,Roth, B. L.,Christopoulos, A.,Sexton, P. M.,Miller, K. J.,Spedding, M. et Mailman, R. B. "Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology." *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1): 1-13(2007).
- Vauquelin, G. et Van Liefde, I. "G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations." *Fundam Clin Pharmacol* **19**(1): 45-56(2005).

- Vilardaga, J. P., Bunemann, M., Feinstein, T. N., Lambert, N., Nikolaev, V. O., Engelhardt, S., Lohse, M. J. et Hoffmann, C. "GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells." *Mol Endocrinol* **23**(5): 590-9(2009).
- Visiers, I., Ballesteros, J. A. et Weinstein, H. "Three-dimensional representations of G protein-coupled receptor structures and mechanisms." *Methods Enzymol* **343**: 329-71(2002).
- Vogel, R., Mahalingam, M., Ludeke, S., Huber, T., Siebert, F. et Sakmar, T. P. "Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors." *J Mol Biol* **380**(4): 648-55(2008).
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G. et Schertler, G. F. "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **454**(7203): 486-91(2008).
- Weir, M. R. et Dzau, V. J. "The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management." *Am J Hypertens* **12**(12 Pt 3): 205S-213S(1999).
- Winzor, D. J. et Jackson, C. M. "Interpretation of the temperature dependence of equilibrium and rate constants." *J Mol Recognit* **19**(5): 389-407(2006).
- Wittelsberger, A., Mierke, D. F. et Rosenblatt, M. "Mapping ligand-receptor interfaces: approaching the resolution limit of benzophenone-based photoaffinity scanning." *Chem Biol Drug Des* **71**(4): 380-3(2008).
- Wittelsberger, A., Thomas, B. E., Mierke, D. F. et Rosenblatt, M. "Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments." *FEBS Lett* **580**(7): 1872-6(2006).

- Wolf, G. "Novel aspects of the renin-angiotensin-aldosterone-system." *Front Biosci* **13**: 4993-5005(2008).
- Worth, C. L., Kleinau, G. et Krause, G. "Comparative sequence and structural analyses of G-protein-coupled receptor crystal structures and implications for molecular models." *PLoS One* **4**(9): e7011(2009).
- Xie, D. et Freire, E. "Structure based prediction of protein folding intermediates." *J Mol Biol* **242**(1): 62-80(1994).
- Xie, J. et Schultz, P. G. "A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 775-82(2006).
- Xu, W., Campillo, M., Pardo, L., Kim de Riel, J. et Liu-Chen, L. Y. "The seventh transmembrane domains of the delta and kappa opioid receptors have different accessibility patterns and interhelical interactions." *Biochemistry* **44**(49): 16014-25(2005).
- Yan, C., Zhan, J. et Feng, W. "Gene polymorphisms of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-converting enzyme in two ethnic groups living in Zhejiang Province, China." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **6**(3): 132-7(2005).
- Yan, L., Holleran, B. J., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. "Analysis of transmembrane domains 1 & 4 of the human angiotensin II AT1 receptor by cysteine-scanning mutagenesis." *J Biol Chem*(2009).
- Yang, K., Farrens, D. L., Altenbach, C., Farahbakhsh, Z. T., Hubbell, W. L. et Khorana, H. G. "Structure and function in rhodopsin. Cysteines 65 and 316 are in proximity in a rhodopsin mutant as indicated by disulfide formation and interactions between attached spin labels." *Biochemistry* **35**(45): 14040-6(1996).

- Ye, S., Kohrer, C., Huber, T., Kazmi, M., Sachdev, P., Yan, E. C., Bhagat, A., RajBhandary, U. L. et Sakmar, T. P. "Site-specific incorporation of keto amino acids into functional G protein-coupled receptors using unnatural amino acid mutagenesis." *J Biol Chem* **283**(3): 1525-33(2008).
- Zou, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Sano, M., Takano, H., Minamino, T., Makita, N., Iwanaga, K., Zhu, W., Kudoh, S., Toko, H., Tamura, K., Kihara, M., Nagai, T., Fukamizu, A., Umemura, S., Iiri, T., Fujita, T. et Komuro, I. "Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II." *Nat Cell Biol* **6**(6): 499-506(2004).