

Université de Sherbrooke

Caractérisation structurale du récepteur de l'urotensine II

Par
Xavier Sainsily
Programme de pharmacologie

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

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre, 2014

Membres du jury d'évaluation
Pr Richard Leduc, département de pharmacologie
Pr Michel Grandbois, département de pharmacologie
Pr Xavier Roucou, département de biochimie
Pr Alain Fournier, département de chimie médicinale et pharmacologie, INRS

© Xavier Sainsily, 2014

À mes parents et mes proches...

*« Ayen san penn, sé zyé ki lach...
...Sé grenn' diri ka fè sak diri »*

Résumé

Caractérisation structurale du récepteur de l'urotensine II

Par
Xavier Sainsily
Programme de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) constituent la plus grande famille de protéines localisées à la membrane plasmique. Toutefois, les mécanismes moléculaires régissant leur liaison avec leurs ligands et la transduction du signal qui s'ensuit sont encore mal compris. Nous avons donc cherché à mieux comprendre le mécanisme de liaison d'un ligand avec son récepteur, et ainsi caractériser le premier événement de la cascade pharmacologique déclenché par ces GPCR. Nous nous sommes intéressés au récepteur de l'urotensine-II (UT), car celui-ci fait partie de la catégorie des récepteurs peptidergiques qui demeure encore à ce jour peu comprise au niveau de leur structure et de leur mode de liaison. D'un point de vue physiologique, ce récepteur joue notamment un rôle important au niveau cardiovasculaire ainsi que dans certaines pathologies comme l'hypertension ou le diabète.

Nous avons donc cherché à identifier l'ensemble des résidus participant à la pochette de liaison du récepteur UT en appliquant la méthode SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method) et en procédant à la substitution individuelle des résidus des TM1, TM2, TM3, TM4 et TM5 avec une cystéine. Par la suite, les paramètres pharmacologiques de ces mutants ont été mesurés à l'aide d'études de radioliasion avec le ligand [¹²⁵I]UUI. Suite au traitement avec de l'hydrobromure de 2-aminoéthyl-méthanéthiosulfonate (MTSEA), nous avons ainsi pu mettre en évidence que les mutants I54C^(1.35) du TM1, Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) et Y111C^(2.64) du TM2, L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) et M134C^(3.36) du TM3 et M184C^(4.60) et I188C^(4.64) du TM4, n'étaient plus capables de lier ¹²⁵I-UUI, démontrant ainsi une orientation de ces positions face à la pochette de liaison du récepteur UT. L'ensemble de ces travaux nous ont permis d'acquérir une meilleure compréhension des déterminants moléculaires de la liaison menant à l'activation du récepteur UT. En associant ces résultats avec nos travaux précédents, nous sommes en mesure de présenter un modèle moléculaire complet de la pochette de liaison du récepteur UT de rat en complexe avec le ligand UUI. Cette étude permet ainsi d'offrir une meilleure compréhension du processus de liaison et d'activation des GPCR peptidergiques de la classe A. En absence de structure cristalline du récepteur UT, ce modèle constitue un outil pharmacologique de choix qui pourra servir notamment à la conception rationnelle de nouveaux ligands thérapeutiques ciblant le système urotensinergique.

Mots clés : Récepteurs couplés aux protéines G, modélisation moléculaire, urotensine-II, récepteur UT, MTSEA, pochette de liaison, SCAM.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	x
Introduction.....	1
1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).....	2
1.2 Classification structurale des GPCR.....	4
1.2.1 Les GPCR de classe A.....	7
1.2.2 Les GPCR de classe B.....	9
1.2.3 Les GPCR de classe C.....	10
1.3 Caractérisation structurale des GPCR de la classe A	10
1.3.1 Le mécanisme de liaison des GPCR de la classe A.....	12
1.3.1.1 La rhodopsine.....	13
1.3.1.2 Les récepteurs monoaminergiques	15
1.3.1.3 Les récepteurs aux nucléosides.....	17
1.3.1.4 Les récepteurs cholinergiques	17
1.3.1.5 Les récepteurs lipidiques	18
1.3.1.6 Les récepteurs peptidergiques	19
1.3.2 Le mécanisme d'activation des GPCR de classe A.....	20
1.3.2.1 Motif (D/E)R ^(3.50) Y et "Ionic lock"	23
1.3.2.2 Motif CWxP ^(6.50) et "Rotamer toggle switch"	24
1.3.2.3 Motif NP ^(7.50) xxY et "Tyrosine toggle switch"	25
1.3.3 Le mécanisme de modulation allostérique des GPCR.....	27
1.4 Le système urotensinergique	30
1.4.1 L'Urotensine II.....	31
1.4.2 L'URP (<i>Urotensin II-related peptide</i>).....	33
1.4.3 Le récepteur UT.....	34
1.4.4 Signalisation du récepteur UT	36
1.4.5 Actions physiologiques et pathophysiologiques du système urotensinergique	37

1.5 Hypothèse et objectifs de l'étude	40
Hypothèse de recherche	41
Objectif 1 : Identification des résidus constituant la pochette de liaison du récepteur UT	41
Objectif 2 : Proposition d'un modèle moléculaire du récepteur UT en complexe avec l'urotensine II	41
Article 1	42
Article 2	77
Discussion	111
Conclusions et perspectives	122
Remerciements	124
Liste des références	125
Annexes	148

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1 Comparaison de la séquence de l'UII et de l'URP de différentes espèces32

Article I

Table 1 Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM3 mutant receptors54

Table 2 Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM4 mutant receptors55

Table 3 Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM5 mutant receptors56

Article II

Table 1 Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM1 mutant receptors89

Table 2 Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM2 mutant receptors90

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 Les GPCR : une super famille très complexe	3
Figure 2 Organisation structurale des GPCR.....	5
Figure 3 Classification structurale des GPCR	6
Figure 4 Nomenclature de Ballesteros-Weinstein pour les GPCR de la classe A.....	8
Figure 5 Structure moléculaire de la rhodopsine	14
Figure 6 Comparaison des pochettes de liaison des GPCR de la classe A	16
Figure 7 Comparaison de la structure moléculaire du récepteur β 2-adrénergique en conformation active et inactive.....	22
Figure 8 Motifs conservés impliqués dans l'activation des GPCR de la classe A	26
Figure 9 Modulation allostérique des GPCR.....	27
Figure 10 Site de liaison orthostérique et allostérique du récepteur muscarinique.	29
Figure 11 Distribution du système urotensinergique.	34
Figure 12 Voies de signalisation intracellulaires classiques du récepteur UT	37

Article I

Figure 1 Schematic representation of the rUT receptor	56
Figure 2 Cell surface expression of rUT receptor mutants.....	57
Figure 3 Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM3	59
Figure 4 Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM4	60
Figure 5 Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM5	61
Figure 6 UII protection of MTSEA-sensitive receptor mutants	63
Figure 7 Functional property of SCAM-positive receptor mutants.....	64
Figure 8 Molecular model of rUT receptor	69

Article II

Figure 1 Schematic representation of the rat UT receptor (rUT)	87
Figure 2 Cell surface expression of rUT receptor mutants	91
Figure 3 Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM1	94
Figure 4 Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM2	95
Figure 5 UII protection of MTSEA-sensitive receptor mutants	96
Figure 6 Functional property of SCAM-positive receptor mutants	97
Figure 7 Molecular model of the UII-liganded rUT receptor	101
Figure 8 Molecular model of the rUT receptor binding pocket.....	103
 Discussion	
Figure 13 Modélisation moléculaire du complexe ligand récepteur rUT/UII	120

LISTES DES ABRÉVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine
ACTH	Adrénocorticotrophine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AT ₁	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
Bpa	<i>p</i> -benzoyl-L-phénylalanine
CRF	<i>Corticotropin-releasing factor</i>
ECL	<i>Extracellular loop</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK ½	<i>Extracellular signal-regulated kinase ½</i>
DAG	Diacylglycérol
ICL	<i>Intracellular loop</i>
ICV	Intra-cérébro-ventriculaire
IP ₁	Inositol monophosphate
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphate
IP ₃ R	Récepteur de l'inositol-1,4,5-triphosphate
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
IUPHAR	<i>International union of basic and clinical pharmacology</i>
LPA	Acide lysophosphatidique
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mGlu	Récepteur métabotrope au glutamate
MLCK	<i>Myosin light-chain kinase</i>
MTSEA	Hydrobromure de 2-aminoéthyl-methanethiosulfonate
NO	Oxyde nitrique
NOP	Récepteur nociceptine/orphanine FQ

OMS	Organisation mondiale de la santé
Orn	Ornithine
P2Y	Récepteur purinergique
PDB	<i>Protein data bank</i>
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
Pen	Penicillamine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPT	Noyau tegmental pédonculopontin
PTH	Parathormone
QNB	Benzilate de 3-quinuclidinyle
Rho A	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SCAM	<i>Substituted cysteine accessibility method</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SII	[Sar ¹ ,Ile ⁴ ,Ile ⁸]-angiotensine II
TM	<i>Transmembrane domain</i>
UII	Urotensine II
URP	<i>Urotensin II- related peptide</i>
UT	Récepteur de l'urotensine II
VFD	<i>Venus flytrap domain</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

INTRODUCTION

Tout au long de l'Histoire, les maladies ont longtemps été considérées par l'homme comme une punition mystique voire divine. Dès l'Égypte ancienne (1600 av. J.-C.), on retrouve des manuscrits faisant état de 700 remèdes aux noms mystérieux parmi lesquels l'opium et l'huile de ricin, encore utilisés aujourd'hui. Ce n'est qu'à partir de l'Antiquité que le père fondateur de la médecine, Hippocrate, dissocia pour la première fois la médecine de la religion; décrivant la maladie comme le fruit de facteurs environnementaux découlant des mauvaises habitudes de vie de l'homme. Bien avant l'avènement de la pharmacologie moderne, l'ensemble des remèdes et traitements appliqués chez l'homme étaient bien souvent inefficaces et pour la plupart néfastes pour le patient. En effet, l'utilisation de la saignée et l'emploi de purgatifs promulgués par la médecine de Galien, constituaient à l'époque les seuls remèdes pour soigner tous les maux. C'est seulement au 16^{ème} siècle que l'alchimiste Paracelse posa les bases de la pharmacologie, en développant notamment la notion de dose-réponse d'un médicament, qui reste aujourd'hui un principe fondamental de cette discipline (Page *et al.*, 1999). La théorie réceptorielle de l'action des drogues apparaîtra quant à elle beaucoup plus tard, à la fin du 19^{ème} siècle, avec le développement de la pharmacopée et le besoin de comprendre le mécanisme d'action des composés actifs. En ce sens, John Langley proposera l'existence de "substances réceptives" permettant la transmission d'un signal via l'administration d'un composé actif (Langley, 1905). Ces observations à la base du modèle d'activation réceptorielle proposé par Clark (Maehle *et al.*, 2002), sont aussi à l'origine de l'élaboration des théories de base de la pharmacologie pour quantifier l'affinité et l'efficacité d'agonistes et d'antagonistes (Hill, 2006). Par la suite, le développement de techniques de clonage et de purification des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), permettra aux pharmacologues de caractériser précisément l'interaction moléculaire entre un ligand et son récepteur. Aujourd'hui de nouveaux essais fonctionnels capables de quantifier la production de seconds messagers sont en plein essor, permettant ainsi de mieux comprendre encore la cascade de signalisation associée à cette famille de récepteur.

1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Même si le concept de récepteur membranaire est apparu pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle (Maehle *et al.*, 2002), la découverte d'une sous-famille de récepteurs capable d'interagir avec des protéines liant des nucléotides guanylés (G protéines) remonte, quant à elle, aux années 1960-1970 (Hill, 2006). Aujourd'hui, les récepteurs couplés aux protéines G, les GPCR, constituent la plus grande famille de récepteurs avec plus de 865 gènes (Fredriksson et Schioth, 2005), ce qui représente approximativement 4 % du génome (Harrow *et al.*, 2012). Leurs implications dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques font aujourd'hui des GPCR une cible thérapeutique de choix pour toute l'industrie pharmaceutique (Overington *et al.*, 2006; Lappano et Maggiolini, 2011). En effet, plus de 30 % des médicaments sur le marché ciblent ces GPCR (Overington *et al.*, 2006). Cette famille compte environ 478 de ces gènes qui codent pour des récepteurs olfactifs ou gustatifs (Fredriksson et Schioth, 2005). Les 375 gènes restants codent pour des GPCR non olfactifs ayant la capacité de lier une très grande diversité de ligands endogènes, les rendant ainsi indispensables au contrôle de l'homéostasie des systèmes du corps humain (Figure 1). Néanmoins, bien que la plupart des GPCR aient été identifiés chez l'homme, il en demeure encore un certain nombre n'ayant toujours pas de ligands connus. On dénombre chez ces récepteurs dits « orphelins » pas moins de 140 GPCR non olfactifs ainsi que la plupart des récepteurs olfactifs (Tang *et al.*, 2012).

D'un point de vue structural, les GPCR se composent de 7 domaines transmembranaires (TM) organisés en hélices α reliées entre elles de part et d'autre par 3 boucles extracellulaires (ECL) et 3 boucles intracellulaires (ICL). Le domaine N-terminal de ces récepteurs est orienté du côté extracellulaire, tandis que l'extrémité C-terminale va interagir avec différentes protéines cytoplasmiques dont certaines sont des protéines effectrices de la signalisation. Les GPCR sont capables de fixer une grande variété de ligands endogènes allant des petites molécules comme les amines biogéniques, jusqu'à des protéines de très grande taille comme des polypeptides (Figure 1). Lorsqu'un ligand se lie à son récepteur, ce dernier va subir des changements conformationnels spécifiques permettant ainsi son activation. Historiquement, le nom de GPCR provient du fait que ces récepteurs membranaires furent caractérisés pour leur capacité d'interagir et d'induire une

signalisation intracellulaire médiée par les protéines G hétérotrimériques. Celles-ci se composent d'une sous-unité $G\alpha$, qui à l'état basal, est liée au GDP ainsi que de deux sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ qui forment un dimère stable. L'activation des GPCR provoque des changements structuraux au niveau de la protéine G qui l'amènera à échanger une molécule de GDP pour une molécule de GTP. Ceci aura pour effet de provoquer la dissociation de la sous-unité $G\alpha$ et du dimère $G\beta\gamma$, permettant ainsi à ces deux entités d'enclencher différents effecteurs spécifiques responsables de la transduction du signal à l'intérieur de la cellule (Figure 1) (Oldham et Hamm, 2008).

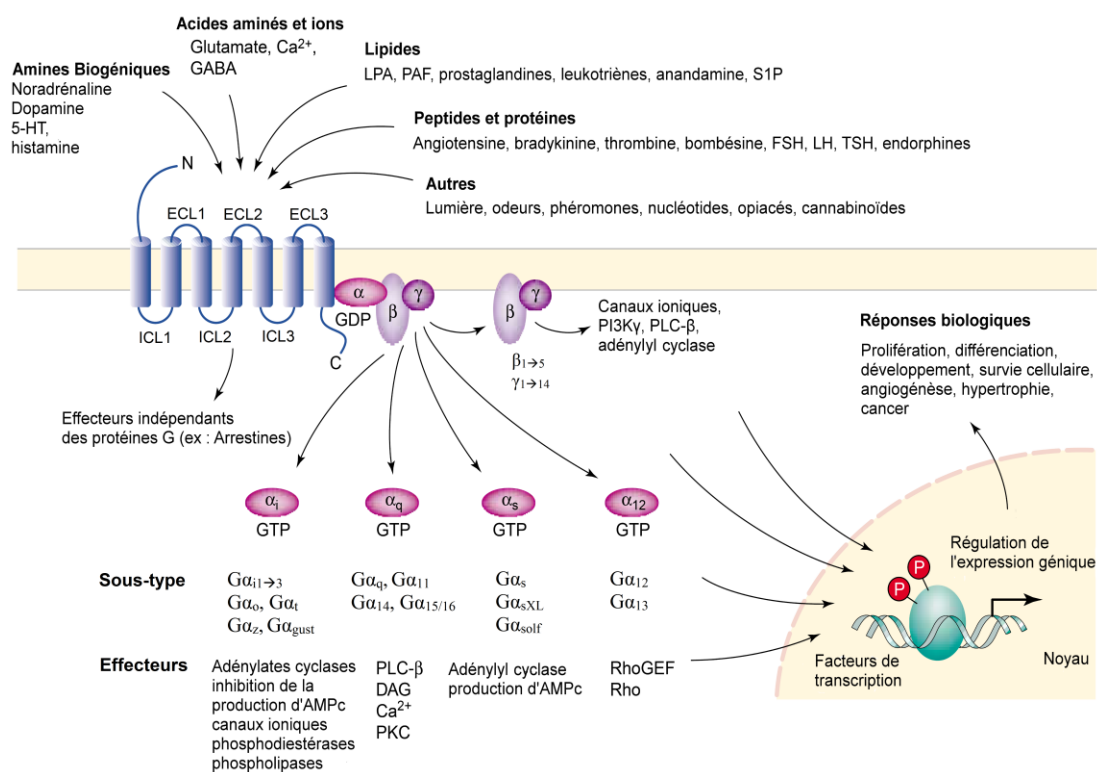


Figure 1. Les GPCR : une super famille très complexe.

Représentation de la variété de ligands capables d'activer les GPCR, et de la grande diversité des voies de signalisation pouvant résulter de cette activation. Figure adaptée de (Marinissen et Gutkind, 2001) et (Dorsam et Gutkind, 2007)

Parmi les 4 grandes classes de sous-unités α (Figure 1), l'activation de la sous-unité $G\alpha_s$ va favoriser la production d'AMPC via l'adénylyl cyclase tandis que la sous-unité $G\alpha_i$, au contraire, viendra inhiber la production d'AMPC. La sous-unité $G\alpha_q$ est quant à elle

responsable de l'activation de la phospholipase C de type β qui viendra cliver le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃). Par la suite, l'IP₃ activera un canal calcique (IP₃R), qui permettra de mobiliser le calcium du réticulum endoplasmique au niveau du cytoplasme. La dernière grande classe de sous-unités $G\alpha$, $G\alpha_{12/13}$, activera la voie des GTPases Rho, responsables entre autres du remodelage du cytosquelette (Wang *et al.*, 2006). Une fois le récepteur activé, sa queue C-terminale sera phosphorylée sur des résidus sérine et/ou thréonine par des protéines kinases spécifiques aux GPCR appelées GRK (Gurevich *et al.*, 2012) ainsi que par les PKA et/ou les PKC (Tobin, 2008). Une fois phosphorylés et dans une conformation active, les GPCR seront capables de recruter les β -arrestines. Cette liaison des arrestines aura pour conséquence d'empêcher la réassociation des GPCR avec les protéines G en plus de cibler ces récepteurs vers des vésicules d'endocytose pour leurs internalisations (Luttrell et Lefkowitz, 2002). Les β -arrestines serviront donc de molécules d'échafaudage entre les récepteurs activés et les différents éléments de la machinerie de désensibilisation et d'internalisation des GPCR comme la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine. De plus, l'arrestine permettra également de recruter plusieurs effecteurs qui enclencheront diverses voies de signalisation comme la voie MAPK indépendamment de l'activation des protéines G (Lefkowitz et Shenoy, 2005).

1.2 Classification structurale des GPCR

Malgré le fait que la structure primaire de tous les GPCR soit très hétérogène, il existe un certain nombre de particularités structurales partagées par tous les membres de cette superfamille, dont la principale est l'organisation en sept domaines transmembranaires (TM). C'est en 1983, avec le clonage de la rhodopsine bovine, que le groupe du Pr Hogness (Nathans et Hogness, 1983) a mis en lumière une structure secondaire heptahélicale similaire à la bactériorhodopsine (Steitz *et al.*, 1982). C'est ensuite le clonage du récepteur β 2-adrénérgique (Dixon *et al.*, 1986) qui permit de mettre en évidence l'existence de très fortes similarités entre ce récepteur et celui de la rhodopsine, que ce soit au niveau de la structure primaire ou secondaire. C'est avec l'essor de la cristallisation dans les années 2000, que nous avons pu visualiser pour la première fois cette structure α -hélicoïdale

d'environ 30 acides aminés très hydrophobes; capable de traverser la membrane plasmique sept fois dans un sens antihoraire pour y ancrer et former le corps du récepteur (Palczewski *et al.*, 2000; Cherezov *et al.*, 2007)

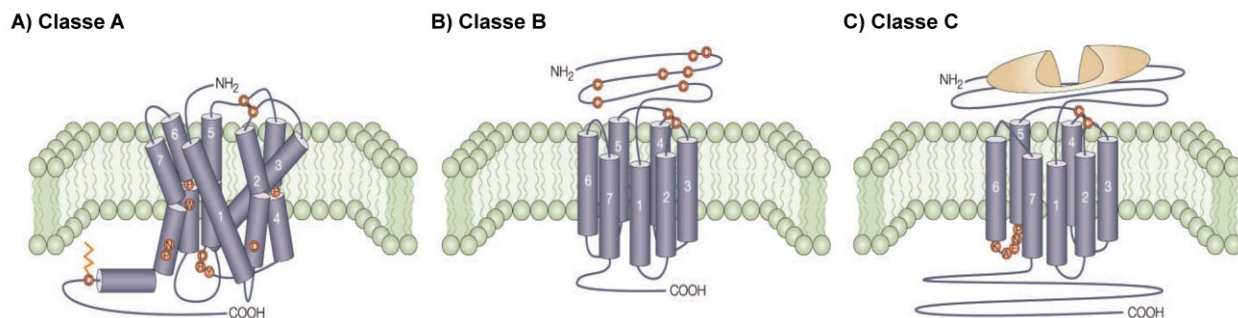


Figure 2. Organisation structurale des GPCR.

Représentation schématique de la structure générale des principales classes de GPCR : la classe A (A) la classe B (B) et la classe C (C). Figure adaptée de (George *et al.*, 2002).

L'identification et la caractérisation des différents GPCR au fil du temps ont mené à une classification ainsi qu'à une nomenclature précise de cette famille de récepteur. Les GPCR de tous les invertébrés et vertébrés peuvent être regroupés selon un système à 6 classes allant de A à F (Attwood et Findlay, 1994; Kolakowski, 1994). De manière plus générale, les GPCR référencés chez l'humain peuvent être séparés selon 3 grandes classes : la classe A qui regroupe les récepteurs similaires à la rhodopsine, la classe B qui regroupe les récepteurs similaires au récepteur de la sécrétine ainsi que la classe C qui regroupe les GPCR apparentés au récepteur du glutamate (Figure 2). De plus, les classes B et C peuvent se subdiviser pour donner respectivement la classe des récepteurs d'adhésions et la classe des récepteurs Frizzled, permettant de former le système de classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste2 et Sécrétine) le plus récent à ce jour (Figure 3) (Fredriksson *et al.*, 2003; Schioth et Fredriksson, 2005).

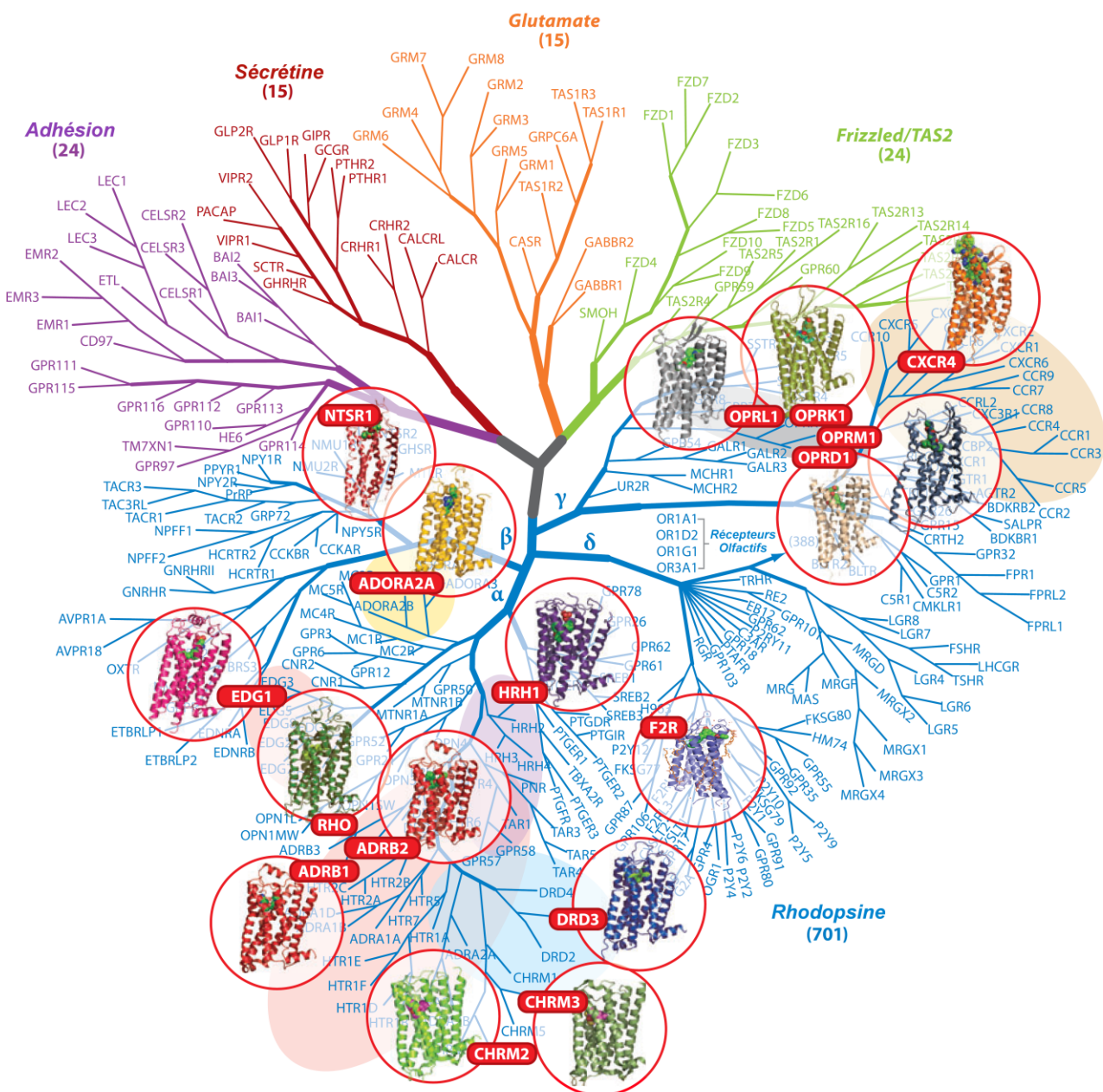


Figure 3. Classification structurale des GPCR.

Dendrogramme de la superfamille des GPCR organisée selon la classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/Taste2 et Sécrétine) indiquant différentes structures cristallographiques connues. Figure adaptée de (Katritch *et al.*, 2013).

1.2.1 Les GPCR de classe A

Les GPCR de la classe A, apparentés à la rhodopsine, forment la famille de récepteur la plus nombreuse et la plus étudiée, regroupant entre autres les récepteurs olfactifs, aminergiques et ceux de certains peptides. Le mécanisme de fixation des différents ligands sur cette classe de récepteurs implique principalement les domaines transmembranaires (TM). La plupart des GPCR de la classe A possèdent un pont disulfure qui relie le TM3 et la deuxième boucle extracellulaire (ECL2), qui va contribuer à l'intégrité structurale du récepteur, stabilisant ainsi un nombre restreint de conformations. Ces GPCR possèdent également des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations et des palmitoylations. Certains d'entre eux possèdent une queue C-terminale ancrée à la membrane via un résidu cystéine palmitoylé (Figure 4). Cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la stabilisation de l'hélice 8 et retrouvée chez certains GPCR de la classe A comme la rhodopsine (Ovchinnikov *et al.*, 1988).

Les GPCR de la classe A sont des récepteurs avec des structures primaires très diversifiées puisque leur homologie de séquence se situe entre 20% et 25% (Katritch *et al.*, 2013). La classe A est caractérisée par la présence de plusieurs résidus et motifs hautement conservés dans l'ensemble de la famille. La plus grande homologie de séquence se trouve à l'intérieur des sept domaines transmembranaires. Afin d'évaluer l'identité de ces résidus spécifiques, plusieurs nomenclatures ont été proposées dont notamment celle de Ballesteros-Weinstein qui demeure la plus utilisée à ce jour (Ballesteros et Weinstein, 1995; Gether et Kobilka, 1998). Cette nomenclature attribue la valeur 50 au résidu le plus conservé de chacun des TM, noté x.50, où x est le numéro du TM. Les autres résidus sont numérotés selon leur positionnement en aval ou en amont de ce résidu conservé (Figure 4). À titre d'exemple, dans la classe A le résidu le plus conservé du TM5 est une proline notée Pro^(5.50). Pour le récepteur de l'urotensine-II, le résidu Gly224^(5.51) indique le résidu situé en C-terminale de cette proline, tandis que chez le récepteur AT₁ de l'angiotensine-II, le résidu correspondant est la Phe208^(5.51). On parle alors de la position 5.51 du récepteur en question. Ce système permet également de mettre en valeur la présence des motifs spécifiques qui caractérisent les GPCR de classe A.

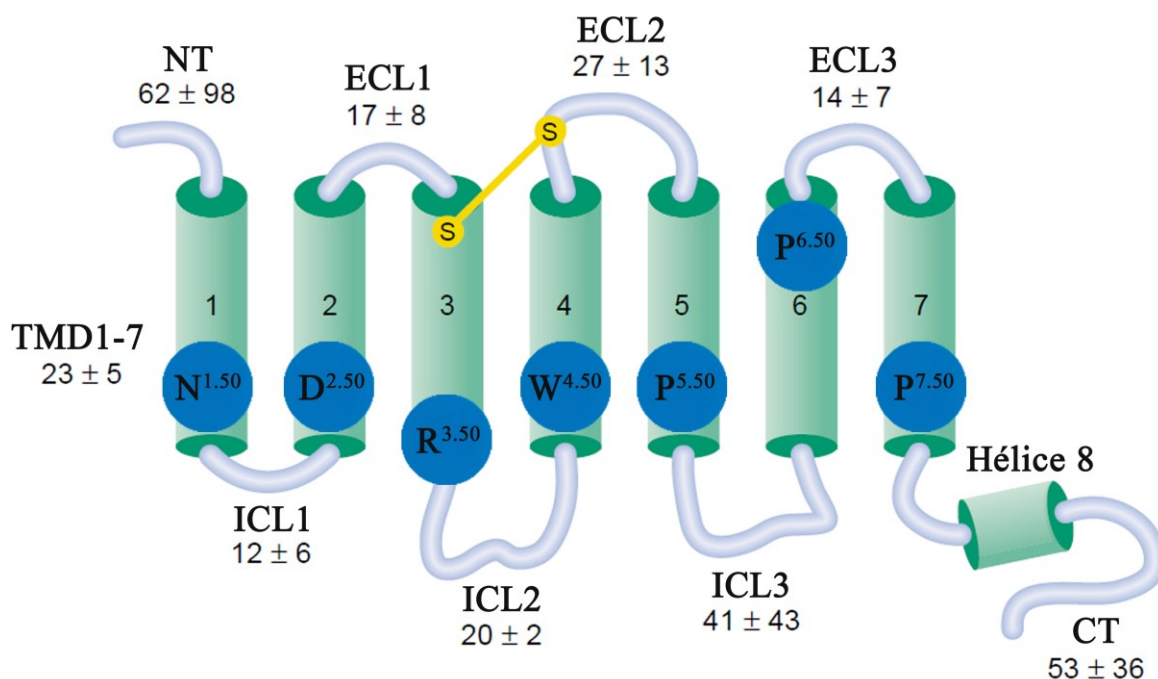


Figure 4. Nomenclature de Ballesteros-Weinstein pour les GPCR de la classe A.

Chacun des résidus les plus conservés de chaque TM se voit attribuer la valeur 50. Les résidus situés au niveau des boucles extracellulaires seront indiqués par la mention ECL et les boucles intracellulaires par la mention ICL. Figure adaptée de (Karnik *et al.*, 2003).

Parmi les résidus hautement conservés chez les GPCR de la classe A, on retrouve le résidu Asn^{1.50} au niveau du TM1 qui participe à un réseau intramolécule de ponts hydrogènes avec un autre résidu hautement conservé Asp^{2.50}, ainsi que les résidus Trp^{6.48}, Asn^{7.45}, Ser^{7.46}, Asn^{7.49} et Tyr^{7.53} des TM6 et TM7 (Ballesteros et Weinstein, 1995). Le résidu Arg^{3.50} participe au motif (D/E)R^(3.50)Y qui est reconnu pour jouer un rôle important au niveau du couplage avec la protéine G. En effet, de nombreuses études ont caractérisé l'interaction entre les résidus Arg^{3.50}, Asp/Glu^{3.49} et Asp/Glu^{6.30} du TM6 communément appelée "ionic lock" et dont certaines mutations peuvent modifier l'activité constitutive ou basale des GPCR (Rovati *et al.*, 2007; Proulx *et al.*, 2008; Trzaskowski *et al.*, 2012). Les résidus proline en position 5.50, 6.50 et 7.50 sont eux responsables de l'orientation et de la flexibilité des TM5, TM6 et TM7 participant activement aux multiples conformations induites des GPCR. Plus précisément, le motif CWXP^(6.50) ou "global toggle switch", fait

intervenir les résidus Trp^{6.48} et Phe^{6.44} qui à l'état inactif font face au TM7, et viendront pivoter vers le résidu Pro^{5.50} à l'état actif, modifiant ainsi l'angle induit par le résidu Pro^{6.50} du motif CWxP^(6.50) (Nygaard *et al.*, 2009). Enfin, le motif NP^(7.50)xxY composé du résidu hautement conservé Pro^{7.50} est situé quant à lui au niveau du TM7 et va moduler la transition de l'état inactif vers l'état actif (Govaerts *et al.*, 2001; Trzaskowski *et al.*, 2012). Tous ces résidus conservés jouent des rôles importants au niveau de l'intégrité structurale des GPCR de la classe A et leurs implications au cours de l'activation de ces récepteurs seront discutées plus en détail dans la section **1.3.2**.

1.2.2 Les GPCR de classe B

Cette classe de GPCR apparentée au récepteur de la sécrétine compte plus de 35 membres regroupant principalement des récepteurs à hormones polypeptidiques comme les récepteurs de la calcitonine, de la PTH (parathormone), du CRF (*corticotropin-releasing factor*), du glucagon, du VIP (*vasoactive intestinal peptide*) et du PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) (Fredriksson *et al.*, 2003). Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine N-terminal très long pouvant atteindre plus de 100 acides aminés, où l'on retrouve plusieurs résidus cystéine impliqués dans un réseau de ponts disulfure (Figure 2). Ce domaine aussi appelé "*secretin family recognition fold*" est grandement impliqué dans la stabilisation d'une structure en hélice α au niveau du ligand. (Parthier *et al.*, 2009; Siu *et al.*, 2013; Hollenstein *et al.*, 2014). Malgré la présence d'un pont disulfure reliant le TM3 avec la boucle ECL2, il n'y a pas de conservation des motifs de la classe A au sein des GPCR de la classe B. En effet, comparativement à la classe A, ces récepteurs possèdent une grande divergence au niveau de la position des résidus proline conservés au sein des TM (Fredriksson *et al.*, 2003; Wootten *et al.*, 2013; Hollenstein *et al.*, 2014) ainsi qu'une absence de motif (D/E)R^(3.50)Y et aucun site de palmitoylation au niveau de la queue C-terminale. C'est en ce sens que Wootten proposa récemment une nomenclature, à l'image de celle de Ballesteros-Weinstein, spécifique aux GPCR de la classe B et qui est communément utilisée aujourd'hui (Wootten *et al.*, 2013).

1.2.3 Les GPCR de classe C

Cette classe apparentée aux récepteurs métabotropiques compte un peu plus de 20 membres regroupant entre autres les récepteurs du glutamate (mGluR), de l'acide γ -aminobutyrique (GABA_B), le récepteur "senseur du calcium" (CaSR), ainsi que certains récepteurs du goût (Pin *et al.*, 2003; Brauner-Osborne *et al.*, 2007). Ces derniers possèdent un domaine N-terminal très long, pouvant compter plus de 500 résidus, appelé "*Venus flytrap domain*" (VFD), et responsable de la liaison du ligand (Figure 2). Les GPCR de la classe C constituent la première classe de GPCR pour laquelle la dimérisation et l'oligomérisation furent reconnues pour agir sur leurs fonctions et leurs activations (Pin *et al.*, 2004). En effet, les récepteurs de la classe C sont exprimés et fonctionnent obligatoirement sous forme dimérique, les récepteurs mGlu étant sous forme homodimérique (Romano *et al.*, 1996), tandis que les GABA_B sont présents sous forme hétérodimérique (Jones *et al.*, 1998). La classe C constitue la toute dernière classe de GPCR à avoir été résolue par cristallographie après la classe F (Wang *et al.*, 2013b). En effet, la cristallisation récente du récepteur métabotrope humain au glutamate (mGlu1), a permis d'observer et de mieux comprendre la structure dimérique ainsi que le mécanisme de modulation allostérique intervenant dans l'activation de ces GPCR (Wu *et al.*, 2014). En plus de proposer une nomenclature propre aux GPCR de la classe C, cette étude a permis d'observer la pochette de liaison d'un modulateur allostérique au sein du mGlu1, qui de manière très intéressante se superpose partiellement avec la pochette orthostérique de certains GPCR de la classe A (Wu *et al.*, 2014).

1.3 Caractérisation structurale des GPCR de la classe A

Depuis la mise en lumière de « substances réceptives » à la fin du 19^{ème} siècle, de nombreux concepts sont apparus et dont certains constituent, encore aujourd'hui, les bases de la pharmacologie moderne. Faisant encore l'objet de débat aujourd'hui, il existe deux hypothèses phares pouvant expliquer la liaison d'un ligand avec son récepteur, il s'agit de l'ajustement induit "*induced fit*" et de la sélection conformationnelle "*conformational selection*" (Hunyady *et al.*, 2003; Hammes *et al.*, 2009; Csermely *et al.*, 2010; Zhou,

2010). L'hypothèse de l'ajustement induit, dérivé du concept de la "clé de serrure" par Koshland (Koshland, 1958), décrit le ligand comme une entité rigide qui va induire et stabiliser une nouvelle conformation du récepteur, qui lui est considéré comme une entité flexible. La sélection conformationnelle, décrite par Straub dans les années 60 (Csermely *et al.*, 2010), propose quant à elle d'imaginer le récepteur comme un ensemble dynamique en équilibre sous différentes conformations. Selon cette hypothèse, le ligand possède une affinité plus grande pour l'une de ces conformations et sa liaison va donc favoriser et stabiliser le récepteur dans cette conformation particulière, et par conséquent provoquer la signalisation associée à celle-ci. Aujourd'hui, de plus en plus d'évidences suggèrent non pas un caractère exclusif de l'une ou l'autre de ces hypothèses, mais bien d'une combinaison de celles-ci pour expliquer le mode de liaison des ligands des GPCR et plus particulièrement ceux de la classe A (Hammes *et al.*, 2009; Csermely *et al.*, 2010; Zhou, 2010).

La complexité de la compréhension de ces mécanismes moléculaires de liaison réside dans la diversité de la superfamille des GPCR, ainsi que sa grande disparité de ligands (Figure 1). Si l'on prend l'exemple de la classe A, ces ligands peuvent être extrêmement petits comme des ions, jusqu'à de grosses macromolécules comme des glycoprotéines ou des particules virales. De manière intéressante, de nombreuses études ont démontré que le site de liaison de différents GPCR de la classe A possédait une architecture commune s'articulant en une pochette de liaison. En effet, que ce soit pour les récepteurs monoaminergiques, ciblant des ligands endogènes de petite taille, ou bien les récepteurs capables de lier des ligands peptidiques plus volumineux; leur site de liaison est situé dans une pochette hydrophile délimitée par la lumière extracellulaire et leurs sept domaines transmembranaires (Cherezov *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2012). De plus, il est très intéressant de noter que plusieurs résidus, impliqués dans le processus de liaison, sont situés à des positions critiques dans les TM de la rhodopsine et du récepteur $\beta 2$ adrénergique et se retrouvent tout autant critiques pour les propriétés de liaison des GPCR peptidergiques (Palczewski *et al.*, 2000; Cherezov *et al.*, 2007; Scheerer *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2012). Ceci suggère ainsi qu'il pourrait y avoir un certain degré de similarité dans les

modes de liaison de tous les GPCR de la classe A. Néanmoins, il a aussi été démontré que les récepteurs peptidergiques possèdent des déterminants cruciaux de liaison au niveau des domaines extracellulaires, qui sont généralement absents chez les GPCR à petits ligands diffusibles (Gether, 2000; Schwartz *et al.*, 2006).

1.3.1 Le mécanisme de liaison des GPCR de la classe A

D'un point de vue pharmacologique, le premier événement responsable de la cascade de signalisation d'une drogue, est justement sa fixation au niveau de son récepteur. Aujourd'hui, il est d'un intérêt considérable de caractériser le mode de liaison des récepteurs peptidergiques de la classe A, étant donné l'implication de ces récepteurs dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques. Parmi l'ensemble des récepteurs de la classe A, ce sont ceux de la lumière (rhodopsine) et des petites amines (adrénergiques, dopaminergiques, cholinergiques) qui sont aujourd'hui les mieux caractérisés pour leur mécanisme de liaison. Ces récepteurs servent aujourd'hui de modèles afin de mieux comprendre les déterminants moléculaires responsables de la liaison de ces différents ligands ainsi que les changements conformationnels associés. Ces investigations représentent aujourd'hui un très grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique. En effet, l'identification des domaines de liaison des GPCR fait actuellement l'objet d'intenses efforts et pourrait mener à la conception rationnelle de nouveaux ligands synthétiques possédant une activité désirée et contrôlée. Cette thèse se concentrera principalement sur la structure des GPCR de classe A. Nous discuterons ainsi de plusieurs récepteurs retrouvés au sein de cette classe ainsi que des différences et des ressemblances, tant au niveau de leur structure générale, que des résidus impliqués au sein de leur pochette de liaison. Une attention particulière a été portée sur la comparaison des résidus précédemment identifiés à l'aide de différentes techniques biophysiques et biochimiques, avec les structures cristallographiques découvertes plus récemment.

1.3.1.1 La rhodopsine

La rhodopsine est historiquement l'un des récepteurs les plus étudiés dans le cadre des recherches portant sur la relation structure-activité des GPCR. Ce récepteur est présent au niveau des cellules photoréceptrices de la rétine qui ont la responsabilité, au niveau de la vision, de convertir et d'amplifier un signal lumineux (Filipek *et al.*, 2003). En absence de lumière, le chromophore 11-*cis*-rétinal est fixé de manière covalente via une base de Schiff protonée à l'intérieur de la pochette de liaison du récepteur pour former la rhodopsine. Le rétinol va agir ici comme un agoniste inverse du récepteur en stabilisant un état inactif de celui-ci. En présence de lumière, il y aura absorption d'un photon par la rhodopsine qui provoquera une photoisomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal, induisant ainsi des changements conformationnels stabilisant la forme active de la rhodopsine : la métarhodopsine II. Ces mouvements enclencheront une signalisation qui se fera via l'action de sa protéine G la transducine (G_T), et permettra l'émission d'une impulsion électrique au niveau du cortex visuel (Palczewski, 2006).

La rhodopsine présente de nombreuses caractéristiques qui vont faciliter son étude en comparaison des autres GPCR. En effet la rhodopsine a l'avantage d'être très abondante dans les bâtonnets de la membrane externe de la rétine, ce qui va grandement faciliter la formation de cristaux de la protéine native. De plus, le fait que le 11-*cis*-rétinal soit lié au récepteur de manière covalente, ceci va maintenir un état inactif, favorisant une meilleure stabilité conformationnelle de la rhodopsine au contraire des GPCR à ligand diffusible (Kobilka, 2007). C'est entre autres pour ces raisons techniques que la rhodopsine fut le premier GPCR dont la structure fut résolue et demeura pour les quelques années suivantes la seule structure moléculaire à haute résolution d'un GPCR (Palczewski *et al.*, 2000). D'un point de vue structural, la rhodopsine est organisée en structure heptahélicale typique des GPCR. La région N-terminale et le domaine ECL2 adoptent chacun une conformation composée de deux feuillets β antiparallèles et forment ce que l'on appelle le "*retinal plug*" obstruant ainsi l'entrée de la pochette de liaison (Figure 5A). Le pont disulfure, hautement conservé parmi les GPCR de classe A, entre la boucle ECL2 et le TM3 permet de stabiliser ce "*retinal plug*" (Palczewski *et al.*, 2000). Le 11-*cis*-rétinal forme quant à lui des

interactions avec plusieurs résidus principalement des TM3, TM6, TM7 ainsi que la boucle ECL2. On y retrouve notamment le résidu Lys296^(7.43) du TM7 qui va interagir avec le TM3 via le résidu Glu113^(3.28) (Figure 5C) pour stabiliser la rhodopsine dans un état inactif (Palczewski *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004).

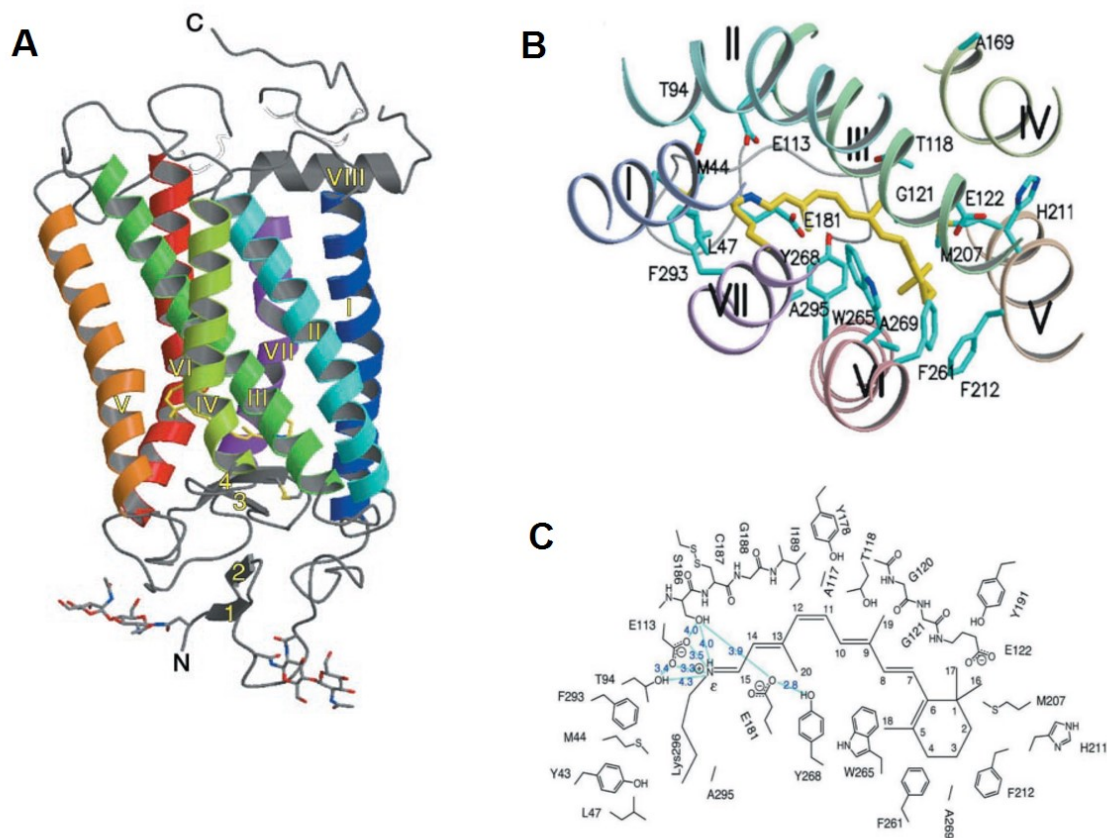


Figure 5. Structure moléculaire de la rhodopsine.

(A) Structure cristallographique de la rhodopsine. Les TM et l'hélice 8 sont numérotés de I à VIII, les feuillets β de la région N-terminale et la boucle ECL2 sont numérotés de 1 à 4, les sites de glycosylation Asn2^{N-term} et Asn15^{N-term} sont représentés en bâtonnets (B) Pochette de liaison du 11-*cis*-rétinal (jaune) avec les chaînes latérales de l'opsine (bleu). (C) Schéma représentatif des résidus situés à moins de 4,5 Å du 11-*cis*-retinal. Figure adaptée de (Palczewski *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Les récepteurs monoaminergiques

Ces GPCR de la classe A composés entre autres des récepteurs β -adrénergiques, sérotoninergiques, histaminiques et dopaminergiques, sont activés par des monoamines : des neurotransmetteurs dérivés d'acides aminés contenant un groupement éthylamine lié à un noyau aromatique. Ces récepteurs monoaminergiques comptent notamment dans leur rang l'un des GPCR les plus étudiés de la classe A, à savoir le récepteur β 2-adrénergique. En effet, celui-ci fut le premier GPCR à ligand diffusible à voir sa structure tridimensionnelle résolue par des études cristallographiques (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). Ce fut également le premier GPCR à être cristallisé en complexe avec sa protéine G ($G_{\alpha s}$), sous sa forme active (Rasmussen *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011). Ces travaux et bien d'autres (Hanson *et al.*, 2008; Ring *et al.*, 2013), ont permis de confirmer les résultats de spectroscopie et de mutagenèse (Strader *et al.*, 1989; Tota et Strader, 1990), concernant la pochette de liaison du récepteur β 2 comprise entre les TM3, TM5, TM6 et TM7 (Figure 6). En effet, on observe notamment que le résidu Asp113^(3.32) interagit via un pont salin avec le groupement amine de différents agonistes et antagonistes des récepteurs adrénérgiques (Strader *et al.*, 1989). Les groupements hydroxyles des ligands monoaminergiques interagissent quant à eux avec les résidus Ser203^(5.42), Ser204^(5.43) et Ser207^(5.46) du TM5 (Strader *et al.*, 1989; Liapakis *et al.*, 2000). Au niveau du TM6, les résidus Phe289^(6.51), Phe290^(6.52) et Asn293^(6.55) participent également à la formation de la pochette de liaison en interagissant directement avec le ligand (Wieland *et al.*, 1996; Rosenbaum *et al.*, 2007). Enfin, nous retrouvons dans le TM7 le résidu Phe312^(7.39) qui serait lui, impliqué dans l'affinité et la sélectivité entre les récepteurs α - et β -adrénérgiques (Suryanarayana *et al.*, 1991).

En comparant les récepteurs β 1 et β 2-adrénérgiques, on remarque que leur boucle ECL2 présente une conformation en hélice α , malgré une grande divergence de la structure primaire de cette région (Warne *et al.*, 2008). Ceci peut vraisemblablement expliquer la sélectivité de ligands entre ces deux récepteurs, ou bien encore, contribuer à la liaison de modulateurs allostériques au niveau de ces GPCR (Wheatley *et al.*, 2012). En analysant la structure moléculaire des autres récepteurs monoaminergiques, on observe une structure et

une pochette de liaison similaires aux récepteurs β -adrénergiques (Chien *et al.*, 2010; Shimamura *et al.*, 2011; Wacker *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013a). Ces travaux nous ont permis d'observer une organisation générale conservée de la pochette de liaison des différents récepteurs monoaminergiques, s'articulant autour des TM3, TM5, TM6 et TM7 à l'état inactif. En effet, outre les résidus strictement conservés Asp^(3.32), Trp^(6.48), Phe^(6.52) et Tyr^(7.43), on observe une conservation des positions 3.33, 3.36, 5.46, 6.51 et 6.55 au sein de la pochette de liaison des récepteurs β 2-adrénergique, H1 de l'histamine, D3 dopaminergique et des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} sérotoninergique (Rosenbaum *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2010; Shimamura *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013a).

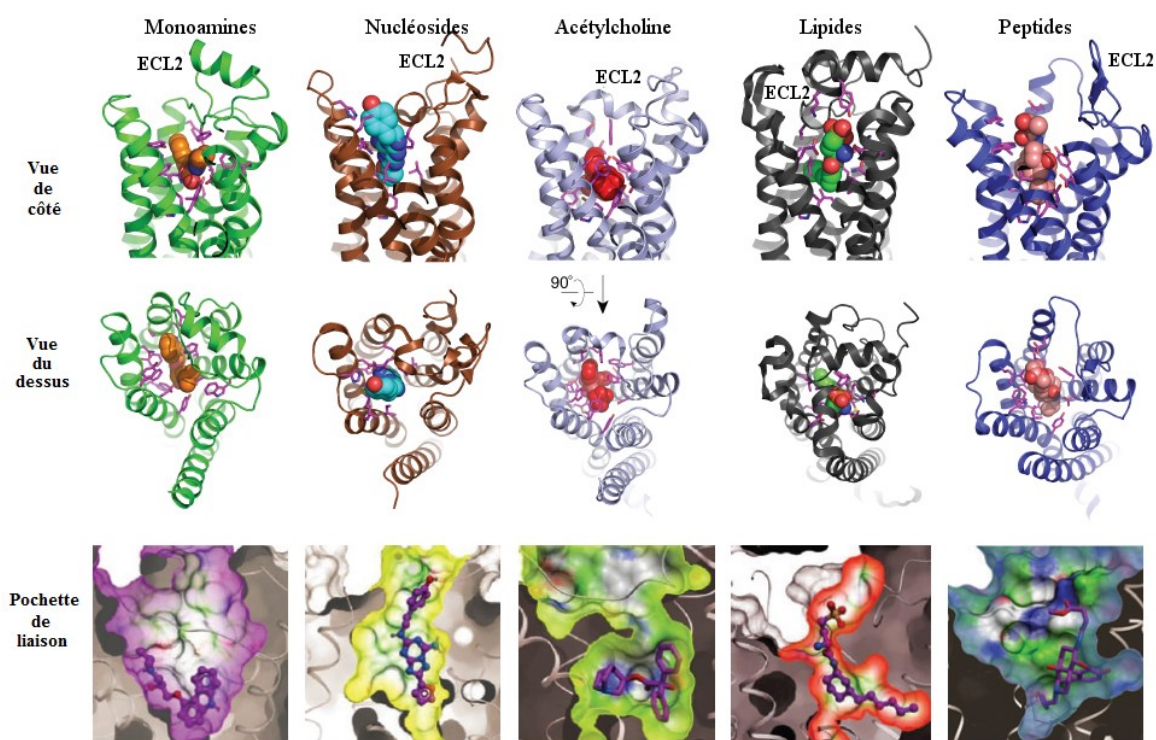


Figure 6. Comparaison des pochettes de liaison des GPCR de la classe A.

Organisation structurale des pochettes de liaison des GPCR de la classe A et de leurs surfaces moléculaires à l'état inactif. De gauche à droite : le récepteur β 2-adrénergique lié au carazolol (PDB : 2RH1), le récepteur adénosine A_{2A} lié au ZM24138 (PDB : 3EML), le récepteur muscarinique M2 lié au benzilate de 3-quinuclidinyle (QNB) (PDB : 3UON), le récepteur sphingosine-1-phosphate lié au ML056 (PDB : 3V2Y) et le récepteur aux μ -opioïdes lié au β -FNA (PDB : 4DKL). Les chaînes latérales situées à l'intérieur de 4 Å du ligand sont représentées en mauve sur les 2 vues. Figure adaptée de (Granier et Kobilka, 2012) et (Katritch *et al.*, 2013).

1.3.1.3 Les récepteurs aux nucléosides

Les nucléosides sont des molécules formées d'une base azotée reliée à un ribose, ou un désoxyribose, via une liaison N-osidique. Ces molécules sont capables d'activer une catégorie de GPCR dont le seul à avoir été cristallisé est le récepteur A_{2A} de l'adénosine (Jaakola *et al.*, 2008; Jaakola *et al.*, 2010; Dore *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Il est très intéressant de noter que ce récepteur ayant la particularité d'avoir trois ponts disulfures au niveau de sa région extracellulaire, possède de nombreuses similitudes avec les récepteurs monoaminergiques. On remarque notamment que l'antagoniste ZM241385, occupe une poche de liaison du récepteur A_{2A} comprise entre les TM3, TM5, TM6 et TM7 ainsi que les boucles ECL2 et ECL3 (Figure 6) (Fredholm *et al.*, 2011). Confirmant ainsi l'importance des résidus Glu169^(5.30), His250^(6.52) et Asn253^(6.55), déjà identifiés comme points de contact avec des agonistes et des antagonistes par des études de mutagenèse (Kim *et al.*, 1995; Kim, *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003). On observe également au niveau du TM7 que les résidus Leu267^(7.32), Met270^(7.35) et Ile274^(7.39) vont interagir avec le ligand ZM241385 au moyen de contacts hydrophobes (Jaakola *et al.*, 2008).

1.3.1.4 Les récepteurs cholinergiques

Les récepteurs cholinergiques sont composés des récepteurs nicotiques de type canaux ioniques, et des récepteurs muscariniques faisant partie de la famille des GPCR de la classe A. Ces GPCR capables de fixer l'acétylcholine sont séparés en cinq sous-types, dont seuls les récepteurs muscariniques M2 et M3 ont vu leurs structures résolues par cristallographie (Haga *et al.*, 2012; Kruse *et al.*, 2012). L'une des particularités de ces récepteurs muscariniques est que l'on y retrouve un canal hydrophile d'une profondeur de 33 Å à partir de la région ECL2. Ce canal contenant la poche de liaison est séparé du cytosol par une barrière de trois résidus hydrophobes conservés à travers les récepteurs muscariniques, à savoir les résidus Leu65^(2.46), Leu114^(4.43) et Ile392^(6.40) (Haga *et al.*, 2012). La poche de liaison des récepteurs muscariniques est située profondément entre les TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7 (Figure 6). Lorsque l'on compare la structure des récepteurs M2 et M3, nous observons que les résidus Asp^(3.32), Tyr^(3.33), Trp^(4.57), Tyr^(6.51),

Asn^(6.52), Tyr^(7.39), Cys^(7.42) et Tyr^(7.43) sont strictement conservés au sein de la poche de liaison de ces récepteurs muscariniques (Haga *et al.*, 2012; Kruse *et al.*, 2012). Les trois résidus tyrosine (Tyr104^(3.33), Tyr403^(6.51) et Tyr426^(7.39) pour le récepteur M2) vont notamment former une poche hydrophobe protégeant ainsi le ligand (Haga *et al.*, 2012; Kruse *et al.*, 2012). Néanmoins, il existe des différences notables au niveau des récepteurs muscariniques, avec notamment la présence du résidu Phe181^(5.33) dans la boucle ECL2 du récepteur M2 qui viendra interagir spécifiquement avec l'un des noyaux phényle du QNB (Haga *et al.*, 2012). Des études de mutagenèse ont également confirmé l'importance de la position 2.61 pour la sélectivité et l'activation des récepteurs muscariniques déjà entrevue au sein des structures des récepteurs M2 et M3 (Lameh *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2007; Lebon *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2012).

1.3.1.5 Les récepteurs lipidiques

Les récepteurs lipidiques font sans doute partie de la catégorie la plus récente des GPCR de la classe A. C'est en effet à partir de travaux portant sur les récepteurs orphelins, que nous avons commencé à apprécier la diversité de ces récepteurs englobant les récepteurs aux cannabinoïdes, les récepteurs de l'acide lysophosphatidique (LPA) ainsi que les récepteurs au sphingosine-1-phosphate (S1P) (Yin *et al.*, 2009). C'est par ailleurs au sein de ceux-ci que l'on retrouve le récepteur S1P₁, qui est le seul de cette catégorie à posséder une structure moléculaire définie et qui servira ici de modèle pour caractériser les récepteurs lipidiques (Hanson *et al.*, 2012). L'une des particularités de la poche de liaison du récepteur S1P est qu'elle se divise en deux régions pour accommoder la nature amphipathique de ses ligands. La première région composée de la portion N-terminale, de la boucle ECL2 et des domaines TM3 et TM7, va interagir via les résidus conservés Arg120^(3.28) et Glu121^(3.29) avec le groupement sphingosine des ligands. Tandis que la deuxième région, délimitée quant à elle par les TM3, TM5, TM6 et TM7, est composée de plusieurs résidus aromatiques, formant ainsi une poche hydrophobe accueillant la chaîne acyle du ligand lipidique.

1.3.1.6 Les récepteurs peptidergiques

Les peptides sont des polymères d'acides aminés bien plus volumineux que les petites molécules ou les composés synthétiques qui ont été cristallisés avec les premiers GPCR à ligands diffusibles. En effet, avec l'essor de la cristallographie, plusieurs groupes se sont intéressés à ces récepteurs peptidergiques. Ce n'est que très récemment que le premier GPCR de cette catégorie fut cristallisé, en l'occurrence, le récepteur CXCR4 en présence de l'antagoniste peptidique CVX15. Globalement la structure du récepteur CXCR4, laisse entrevoir une pochette de liaison délimitée par les TM3, TM5, TM6 et TM7. On observe au niveau de cette pochette, une inclinaison très prononcée des TM2 et TM6 via les résidus Pro92^(2.58) et Pro254^(6.50), permettant ainsi à la pochette de liaison d'être plus exposée et d'offrir une plus grande accessibilité (Wu *et al.*, 2010). Nous pouvons noter également que la boucle ECL2 adopte une structure en feuillets β antiparallèles permettant de réguler, avec la portion N-terminale, l'entrée de la pochette de liaison. Des études de mutagenèse ont par ailleurs démontré que les résidus Asp97^(2.63), Asp171^(4.60), Asp262^(6.58) et Glu288^(7.39) ainsi que les résidus extracellulaires Asp187^(ECL2) et Arg188^(ECL2) sont importants pour la liaison de SDF-1 α , le ligand endogène de CXCR4 (Brelot *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que tous ces résidus se retrouvent dans la pochette de liaison du récepteur CXCR4 et interagissent avec l'analogue peptidique CVX15 ainsi que l'antagoniste non peptidique IT1t (Wu *et al.*, 2010). De plus, la résolution récente de la structure cristallographique du récepteur CCR5, a mis en évidence la conservation des résidus Tyr89^(2.63), Tyr108^(3.32), Phe109^(3.33) et Glu283^(7.39) au sein de la pochette de liaison de ces récepteurs aux chimiokines (Tan *et al.*, 2013).

Au sein de la famille des récepteurs peptidergiques, nous retrouvons également la structure cristallographique des récepteurs aux opiacés (κ , δ , μ , nociceptine/orphanine FQ), responsable de l'activité des endorphines, des enképhalines, des dynorphines ainsi que des dérivés de l'opium comme la morphine et l'héroïne. Ces récepteurs régulent plusieurs processus, principalement la perception de la douleur et partagent une pochette de liaison très accessible du point de vue extracellulaire (Granier *et al.*, 2012; Manglik *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012) et très similaire à celle du CXCR4 (Figure 6). Les

résidus Asp128^(3.32), Tyr129^(3.33), Ile277^(6.51), His278^(6.52) et Val281^(6.55) constituent les déterminants moléculaires conservés parmi tous les récepteurs aux opiacés. De plus, tous ces récepteurs partagent une structure de type β -hairpin au niveau de la région ECL2, que l'on retrouve chez toutes les structures résolues de cette classe incluant le récepteur CXCR1 (Park *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

1.3.2 Le mécanisme d'activation des GPCR de classe A

L'activation des GPCR est une étape primordiale dans le processus de transduction d'un signal extérieur vers l'intérieur de la cellule. Dans le modèle le plus simple d'activation, le ligand agoniste va stabiliser une conformation active du récepteur, engageant à son tour des effecteurs intracellulaires qui sont responsables de la réponse cellulaire (Kenakin, 2002; Kenakin, 2003). Outre la structure commune des GPCR organisés en sept TM au sein de la membrane plasmique (Palczewski *et al.*, 2000), il existe plusieurs résidus et motifs conservés par les GPCR de la classe A qui sont impliqués dans ce processus d'activation (Smit *et al.*, 2007; Trzaskowski *et al.*, 2012). Aujourd'hui, de plus en plus d'évidences indiquent que les GPCR sont en équilibre constant entre plusieurs conformations, et ce sont ces motifs moléculaires conservés qui permettent d'opérer à ces changements au niveau structural (Nygaard *et al.*, 2009).

C'est vers la fin des années 90, avec le développement de techniques biophysiques et biochimiques, que l'on a pu détecter pour la première fois des changements de conformations au niveau des GPCR. En effet, c'est par l'intermédiaire d'approches combinées de spectroscopie et de mutagenèse que plusieurs groupes, ont pu mettre en évidence des changements de conformations chez la rhodopsine (Lin et Sakmar, 1996), ainsi que chez le récepteur β 2-adrénergique (Gether *et al.*, 1995; Kobilka *et al.*, 1999). Ces études ont également démontré que ces changements conformationnels pouvaient être différents selon la nature du ligand, les agonistes étant capables de stabiliser des états bien différents des antagonistes et même des agonistes partiels (Gether *et al.*, 1995; Kobilka, *et al.*, 1999). Aujourd'hui, de plus en plus d'évidences confirment que l'efficacité de signalisation d'un récepteur va dépendre d'un éventail de conformations pouvant être induites par un même ligand (Kobilka et Deupi, 2007). En effet, des études de simulation

dynamique moléculaire à partir des structures cristallographiques du récepteur β 2-adrénergique ont ainsi démontré qu'en présence d'un ligand ce récepteur est capable d'adopter plusieurs conformations dites intermédiaires entre l'état inactif et l'état actif (Dror *et al.*, 2009; Dror *et al.*, 2011b). La pochette de liaison serait ainsi connectée de manière très souple avec le site de liaison de la protéine G, permettant ainsi au récepteur de fluctuer entre plusieurs conformations (Dror *et al.*, 2011a). Suivant ce modèle, le processus d'activation se ferait d'abord au niveau du site d'interaction de la protéine G. L'agoniste permettant uniquement de stabiliser une conformation active du connecteur, maintenant le site de liaison de la protéine G en conformation intermédiaire ou active. Plus récemment, des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur le récepteur β 2-adrénergique ont permis de confirmer plusieurs états conformationnels actifs, intermédiaires, mais aussi inactifs de ce récepteur (Kofuku *et al.*, 2012; Nygaard *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013).

Au cours des dernières décennies, les études cristallographiques ont déployé beaucoup d'efforts pour mettre en lumière la structure moléculaire des GPCR sous leurs formes actives, ces structures étant en minorité par rapport aux structures inactives (Audet et Bouvier, 2012). La cristallisation récente du récepteur β 2-adrénergique en conformation active, nous a permis de constater que la pochette de liaison subissait très peu de changements entre la conformation active et inactive (Figure 7A, B, C) (Rasmussen *et al.*, 2011a; Rasmussen *et al.*, 2011b; Rosenbaum *et al.*, 2011). Si l'on se place d'un point de vue extracellulaire, on remarque un repositionnement du TM5 vers l'intérieur du récepteur au niveau du site de fixation de l'agoniste BI-167107 (Figure 7B). En revanche, si l'on se place d'un point de vue intracellulaire on peut observer des changements conformationnels indéniables lors de l'activation, spécialement au niveau des motifs conservés (D/E)R^(3.50)Y et NP^(7.50)xxY ainsi que le CWxP^(6.50) (Figure 7C). Le mouvement le plus important se situe au niveau du repositionnement du TM6 qui va ainsi ouvrir une cavité dans laquelle la sous-unité G α_s va venir s'arrimer (Figure 7A). Outre le repositionnement du TM6, on remarque également un léger repositionnement du TM5 vers l'extérieur du récepteur, alors que le TM3 et le TM7 vont eux se déplacer vers l'intérieur du récepteur (Figure 7B). L'identification et la caractérisation des différentes conformations qui composent

l'équilibre conformationnel d'un même récepteur nous permettront ultimement de concevoir des composés synthétiques plus spécifiques à certains états. Ces composés pourront avoir une activité plus contrôlée, éliminant ainsi les voies de signalisation non désirées qui pourraient mener à des effets secondaires. Nous discuterons dans ces sections des principaux motifs moléculaires impliqués dans l'activation des GPCR et par quel moyen ceux-ci nous permettent de mieux caractériser et comprendre les états conformationnels des récepteurs de la classe A.

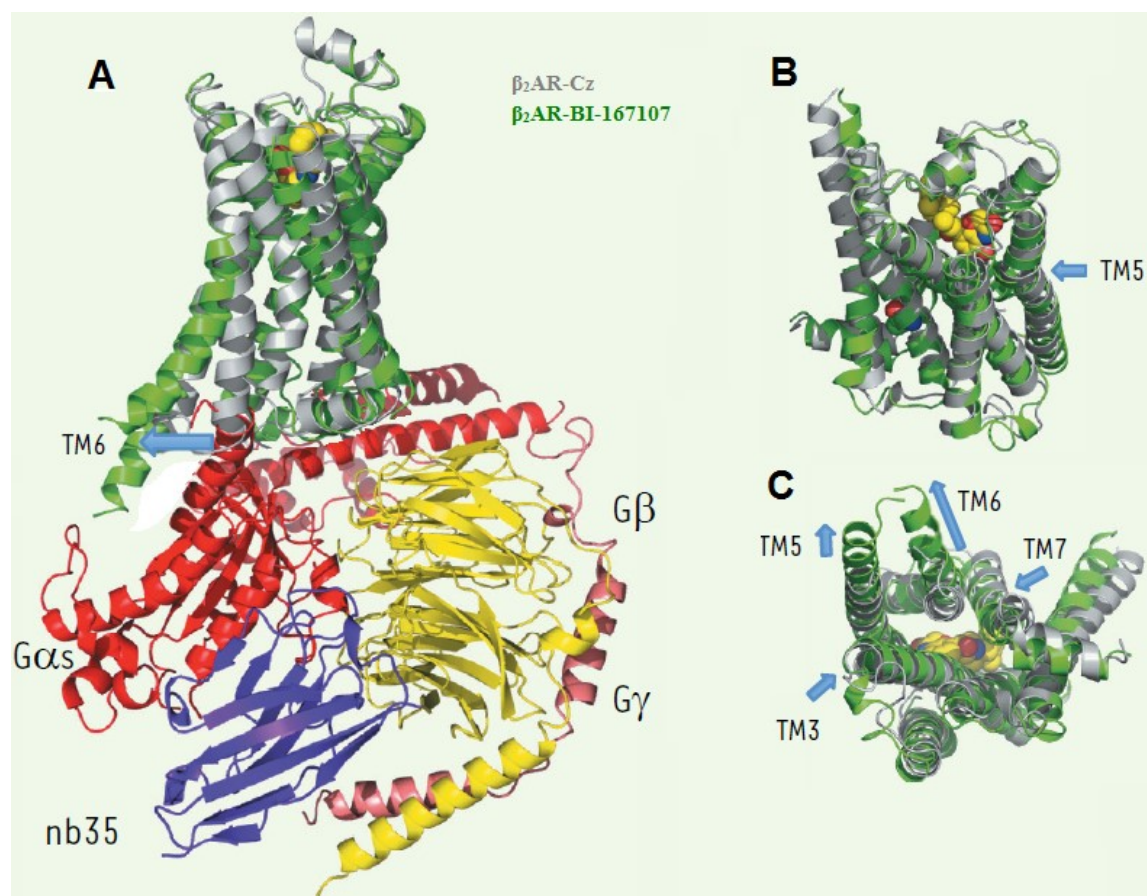


Figure 7. Comparaison de la structure moléculaire du récepteur β_2 -adrénergique en conformation active et inactive.

(A) Superposition de la structure inactive liée au carazolol (β_2 AR-Cz en gris) avec la conformation active liée à l'agoniste BI-167107 (β_2 AR-BI-167107 en vert) en complexe avec la protéine G trimérique (α en rouge, β en jaune et γ en rose). (B) Mouvements conformationnels vus de la surface extracellulaire du β_2 -AR. (C) Mouvements conformationnels vus de la surface intracellulaire du β_2 -AR. L'anticorps de lama nb35 (violet) stabilise la sous-unité G α_s . Figure adaptée de (Lebon et Tate, 2012).

1.3.2.1 Motif (D/E)R^(3.50)Y et "Ionic lock"

Parmi les différents motifs hautement conservés des GPCR de la classe A, le motif (D/E)R^(3.50)Y est sans doute celui qui a été le plus étudié. Ce motif est situé à la base du TM3, à l'interface de la boucle intracellulaire ICL2, et se compose d'un résidu aspartate (ou glutamate) en position 3.49, d'une arginine en position 3.50 et d'une tyrosine en position 3.51. Plusieurs études ont démontré un rôle central de ce motif dans la régulation de l'état conformationnel des GPCR de la classe A (Rovati *et al.*, 2007; Proulx *et al.*, 2008; Trzaskowski *et al.*, 2012). C'est à partir d'études de spectroscopie sur des récepteurs mutés incorporant des sondes fluorescentes que l'on a pu observer les premiers changements conformationnels entre le TM3 et le TM6 (Gether *et al.*, 1995; Farrens *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2001). Plus tard, des études de mutagenèse sur le récepteur β 2-adrénérique vont démontrer que l'interaction entre les résidus Glu^(3.49), Arg^(3.50) du motif (D/E)R^(3.50)Y avec le résidu Glu^(6.30) du TM6, est nécessaire au maintien d'un état inactif du récepteur. En effet, des mutations abolissant la charge des résidus Glu^(3.49) ou Glu^(6.30) engendrent une activité constitutive du récepteur β 2-adrénérique (Rasmussen *et al.*, 1999; Ballesteros *et al.*, 2001). Ce sont ces interactions entre les résidus des TM3 et TM6 qui forment une sorte de serrure ionique, que l'on appelle "ionic lock".

En comparant la structure cristallisée de la rhodopsine inactive avec celle de l'opsine, on observe que cet "ionic lock" est brisé, reflétant une conformation active de l'opsine (Park *et al.*, 2008; Scheerer *et al.*, 2008). On remarque ainsi que le TM6 s'éloigne du TM3 tout en formant de nouvelles interactions avec le TM5, permettant ainsi au résidu Arg^(3.50) d'interagir avec le fragment C-terminal de la protéine G. Ces observations se confirment avec la structure de la métarhodopsine II et du mutant constitutivement actif de la rhodopsine (Choe *et al.*, 2011; Standfuss *et al.*, 2011). D'autres études ont également suggéré que lors de l'activation, les résidus du motif (D/E)R^(3.50)Y sont impliqués dans une interaction directe avec la protéine G. En effet, une mutation à l'intérieur de ce motif peut aussi conduire à une forme inactivable du récepteur (Rovati *et al.*, 2007; Proulx *et al.*, 2008). La résolution de la forme cristalline de l'opsine et de la métarhodopsine II, en complexe avec un fragment de la sous-unité α de la protéine G semble appuyer cette

hypothèse. En effet, cette structure met en lumière une interaction directe entre le motif (D/E)R^(3.50)Y et un fragment de la sous-unité Ga (Scheerer *et al.*, 2008, Choe *et al.*, 2011).

La structure moléculaire de plusieurs récepteurs cristallisés comme la rhodopsine, le récepteur dopaminergique D3 et le récepteur A_{2A} de l'adénosine, semble appuyer cette hypothèse d'un "ionic lock" maintenu à l'état inactif entre le TM3 et le TM6 (Palczewski *et al.*, 2000; Jaakola *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2010; Dore *et al.*, 2011). Néanmoins, il apparaît que les structures cristallographiques des récepteurs β-adrénergiques, du récepteur CXCR4 et du récepteur H1 de l'histamine ne maintiennent pas ce motif intact à l'état inactif, ceci étant dû à une différence d'orientation ou une absence des résidus participant à ce motif (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010; Shimamura *et al.*, 2011). Des études de simulation dynamique à partir des structures des récepteurs β-adrénergiques ont d'ailleurs récemment proposé l'hypothèse qu'il existerait au moins deux conformations inactives de ces récepteurs dont une où l'"ionic lock" serait maintenu (Dror, *et al.*, 2009; Moukhametzianov *et al.*, 2011). Il est fort probable que les modifications apportées à l'ensemble de ces récepteurs, afin d'augmenter la stabilité conformationnelle nécessaire à leur cristallisation, aient favorisé un état où cet "ionic lock" n'est pas maintenu. En revanche, il est très facile d'observer une forte proximité entre le TM3 et le TM6, ce qui favorise d'autres interactions stabilisatrices de l'état inactif pour ces récepteurs. Néanmoins, il existe un point commun pour l'ensemble de ces GPCR, il s'agit en effet de l'éloignement du TM6 par rapport au TM3, qui apparaît comme un prérequis très important dans l'activation de ces récepteurs (Figure 8G, H, I).

1.3.2.2 Motif CWxP^(6.50) et "Rotamer toggle switch"

L'ensemble des travaux portant sur le motif (D/E)R^(3.50)Y a certes permis de mettre en évidence des mouvements entre les TM6 et le TM3, mais ils ont surtout mis en lumière le rôle important du changement conformationnel opéré chez le TM6. En effet, au fil des comparaisons de structures à l'état actif et inactif des GPCR, on se rend compte du rôle central de ce domaine au cours de l'activation de ces récepteurs (Park, *et al.*, 2008; Scheerer *et al.*, 2008; Choe *et al.*, 2011; Rasmussen *et al.*, 2011a; Rasmussen *et al.*, 2011b;

Rosenbaum *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Parmi les résidus conservés du TM6, nous retrouvons le résidu Pro^{6.50} faisant partie du motif CWxP^(6.50) très conservé au sein des GPCR de la classe A. D'un point de vue structural, la présence d'une proline au sein d'un segment hélicoïdal va introduire une déviation dans l'hélice, créant ainsi un coude communément appelé "*kink*". Il a donc été proposé que cette proline agisse en tant que charnière moléculaire lors de l'activation des GPCR de la classe A. En effet, ce motif CWxP^(6.50) va réguler l'orientation de ce TM6 lors de l'activation, constituant ainsi le "*rotamer toggle switch*" (Shi *et al.*, 2002). Selon le modèle, des interactions intramoléculaires vont garder les positions Cys^(6.47) et Trp^(6.48) dans une orientation favorisant le maintien de la forme inactive. Chez les récepteurs monoaminergiques, nous observons que les résidus Phe^(6.44), Trp^(6.48), Phe^(6.51) et Phe^(6.52) situés face à la pochette de liaison pourraient potentiellement interagir avec l'agoniste et promouvoir un réarrangement du TM6 en modifiant l'angle induit par le résidu Pro^(6.50) (Javitch *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1999; Ballesteros *et al.*, 2001). Un mouvement de pivot autour de cette charnière pourrait mener à un déplacement à l'état actif du TM6, qui s'éloignerait du domaine TM3 et du TM7, pour interagir davantage avec le TM5. Ce mouvement serait caractérisé par un changement conformationnel rotationnel du résidu Trp^(6.48), pour former une interaction avec le résidu Phe^(5.47) (Figure 8A, B et C) (Schwartz *et al.*, 2006).

1.3.2.3 Motif NP^(7.50)xxY et "*Tyrosine toggle switch*"

Le dernier motif NP^(7.50)xxY, situé dans le TM7 des GPCR de la classe A, pourrait quant à lui jouer le rôle d'interrupteur moléculaire dans la transition du récepteur de son état basal vers son état actif (Govaerts *et al.*, 2001; Urizar *et al.*, 2005). À l'intérieur de ce motif situé au cœur d'un réseau de ponts hydrogènes, le résidu Asn^(7.49) interagit avec le TM6, alors que le résidu Tyr^(7.53) pourrait lui, interagir avec l'hélice 8 située en C-terminal, stabilisant ainsi un état inactif du récepteur (Fritze *et al.*, 2003; Urizar *et al.*, 2005). Lors de l'activation, le mouvement du TM6 vers le TM5, va provoquer une réorganisation du réseau de ponts hydrogènes du motif NP^(7.50)xxY, pour venir interagir avec le motif (D/E)R^(3.50)Y du TM3. C'est ce mouvement conformationnel que l'on va appeler "*tyrosine toggle switch*" (Standfuss *et al.*, 2011; Trzaskowski *et al.*, 2012). Lorsque l'on observe la

structure de la rhodopsine, il existe clairement une interaction entre l'hélice 8 et le TM7 (Figure 8D), qui est rompue lors de l'activation de ce récepteur. De manière intéressante, cette interaction est absente chez d'autres GPCR de la classe A, comme le récepteur β 2-adrénérique ou le récepteur A_{2A} de l'adénosine (Figure 8E, F). Ceci maintient donc le doute sur le fait que cette interaction soit conservée, et qu'elle permette réellement de maintenir les GPCR dans un état inactif (Trzaskowski *et al.*, 2012). Néanmoins, en comparant la structure des GPCR à l'état actif et inactif, il ne semble pas y avoir de doute quant à un mouvement conformationnel autour du résidu Tyr^(7.53) du TM7 vers le TM3, favorisant ainsi l'état actif des GPCR de la classe A.

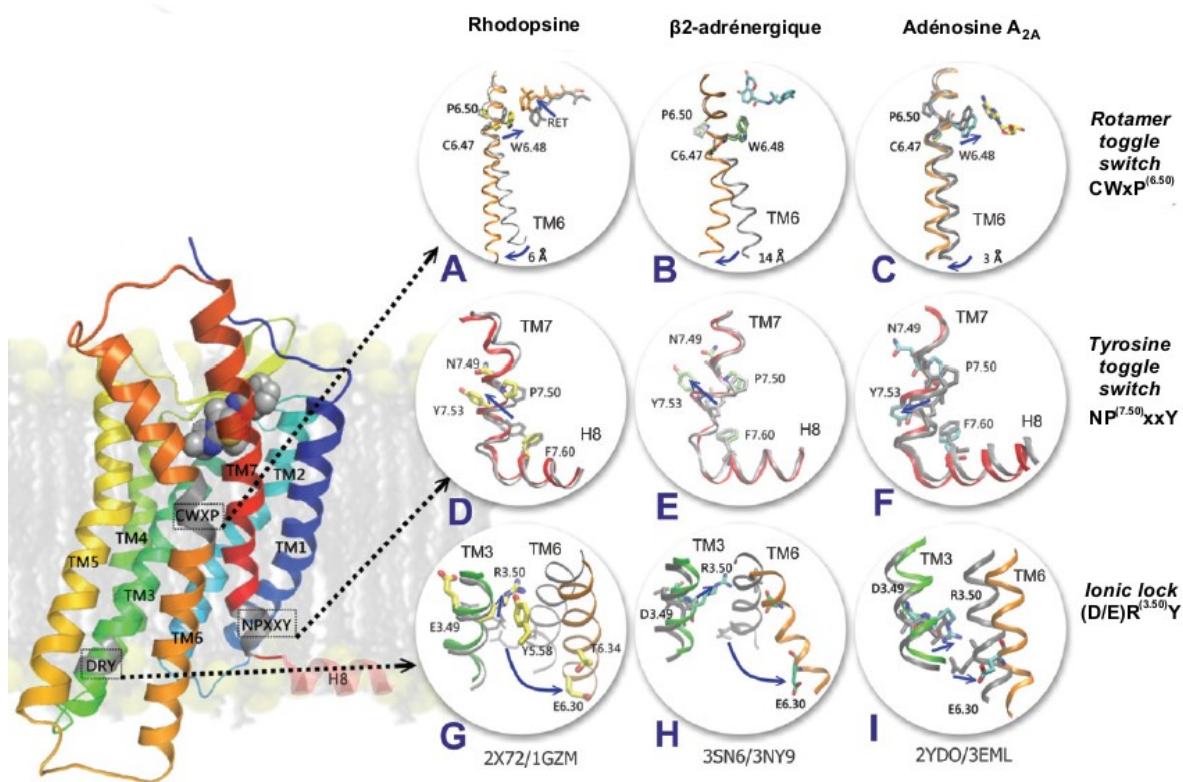


Figure 8. Motifs conservés impliqués dans l'activation des GPCR de la classe A.

Représentation du "rotamer toggle switch" incluant le motif CWXP^(6.50) (A, B, C), du "tyrosine toggle switch" incluant le motif NP^(7.50)xxY (D, E, F) ainsi que de l'"ionic lock" (G, H, I) selon les structures cristallographiques de la rhodopsine (A, D, G), du récepteur β 2-adrénérique (B, E, H) et du récepteur de l'adénosine A_{2A} (C, F, I). Les structures utilisées pour l'état inactif (gris) ou actif (couleurs) sont identifiées selon leur code PDB. Figure adaptée de (Trzaskowski *et al.*, 2012).

1.3.3 Le mécanisme de modulation allostérique des GPCR

Tous les mécanismes de liaison et d'activation des GPCR de la classe A, que nous avons abordé jusqu'à maintenant, s'articulent autour du mode de liaison des ligands endogènes au sein de la pochette de liaison orthostérique, appelée « site actif ». L'allostérie est un mécanisme un peu différent, par lequel une molécule se fixant sur un autre site que le « site actif », va traduire un changement d'activité et de conformation du GPCR (Figure 9). L'une des propriétés des modulateurs allostériques est le fait que ce dernier, ainsi que le ligand endogène peuvent lier simultanément le récepteur. D'un point de vue pharmacologique, le modulateur allostérique possède des effets qui sont saturables et module l'affinité ou l'activité du ligand endogène (Kenakin et Miller, 2010).

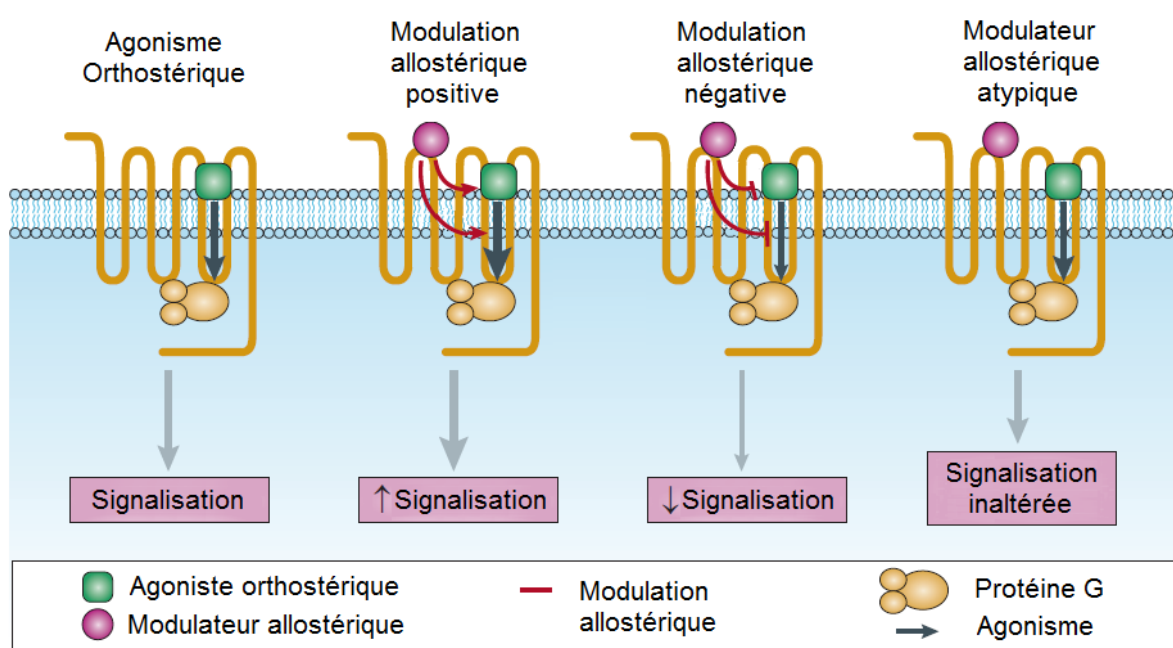


Figure 9. Modulation allostérique des GPCR.

L'agoniste vient se lier au niveau de la pochette de liaison orthostérique de son GPCR, induisant un changement de conformation associé à une cascade de signalisation. Le modulateur allostérique va venir se fixer sur un site topographique distinct de l'agoniste orthostérique et venir modifier positivement ou négativement la composante signalétique induite par l'agoniste. Le modulateur allostérique atypique viendra se fixer sur le GPCR sans altérer cette signalisation. Figure adaptée de (Wootten *et al.*, 2013).

Plus important encore, ces modulateurs allostériques modifient l'état conformationnel du récepteur pour en faire une nouvelle entité fonctionnelle, rendant ces molécules très utiles pour cibler une réponse spécifique. Il existe ainsi, certains modulateurs allostériques positifs qui favorisent soit la liaison du ligand orthostérique ou qui augmente l'activité signalétique. Dans le cas du récepteur du glutamate, ces modulateurs allostériques sont capables de potentialiser préférentiellement la mobilisation calcique aux dépens de l'activation de la voie MAPK "*mitogen-activated protein kinases*" (Zhang *et al.*, 2005). Il existe également certains modulateurs allostériques classés comme « atypiques », dont la liaison au site allostérique n'affectera pas l'affinité ou l'activité induite par le ligand orthostérique (O'Brien *et al.*, 2003).

Le premier GPCR pour lequel une régulation allostérique fut démontrée est le récepteur M2 muscarinique, qui demeure encore à ce jour l'un des récepteurs les plus étudiés pour ce mécanisme (Gregory *et al.*, 2007) (Figure 10). La pochette de liaison des récepteurs muscariniques étant hautement conservée, il existe un grand intérêt autour des ligands allostériques se liant au niveau des domaines extracellulaires de ces récepteurs, où l'homologie de séquence est plus faible (Haga *et al.*, 2012) (Figure 10). Comme nous le précisons dans la section 1.3.1.4, les récepteurs M2 et M3 présentent un canal hydrophile contenant la pochette de liaison, formant ainsi un « vestibule » qui s'étend des domaines extracellulaires jusqu'au cœur des domaines transmembranaires (Haga *et al.*, 2012; Kruse *et al.*, 2012; Kruse *et al.*, 2013; Kruse *et al.*, 2014). Des études de simulation ont démontré que les ligands orthostériques traversant ce « vestibule » pour venir se lier au niveau des TM, peuvent adopter plusieurs conformations intermédiaires au niveau des sites de liaison allostériques de ces récepteurs (Redka *et al.*, 2008). Récemment, des ligands « bitopiques », spécifiques des récepteurs muscariniques ont même été synthétisés. Ces pharmacophores sont capables de lier simultanément la pochette de liaison orthostérique et allostérique, permettant ainsi de modifier l'affinité et l'activité de cette classe de récepteur (Lane *et al.*, 2013; Kruse *et al.*, 2014). Cette nouvelle catégorie de molécule prometteuse est d'ores et déjà à l'étude dans le cadre du traitement de certaines pathologies humaines (Davie *et al.*, 2013).

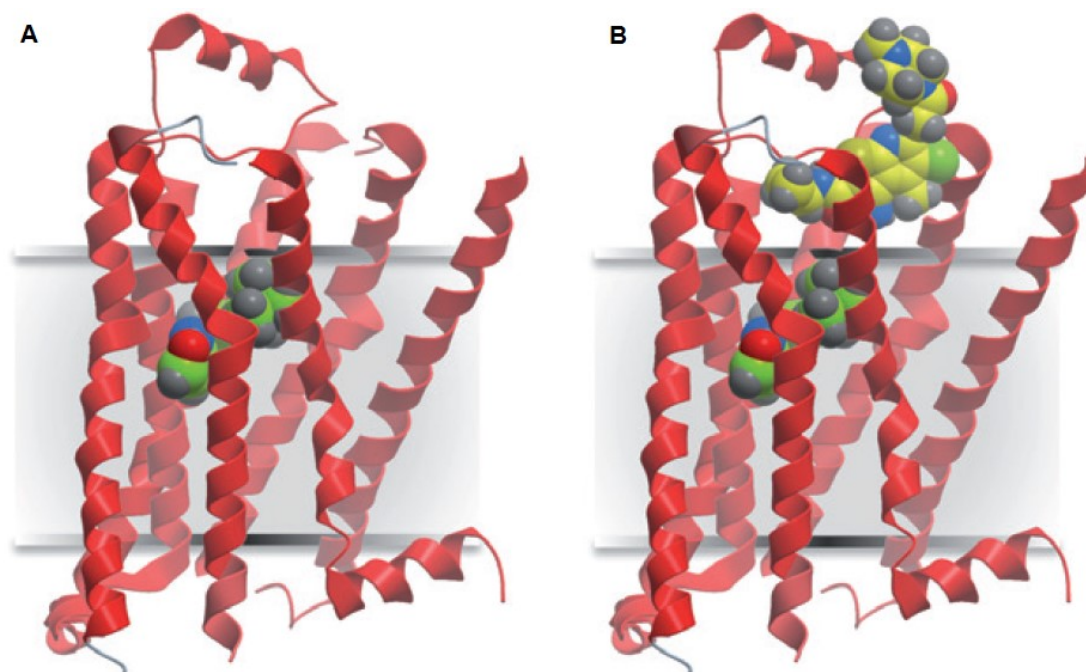


Figure 10. Site de liaison orthostérique et allostérique du récepteur muscarinique.

Modélisation moléculaire du récepteur muscarinique M2 en présence du ligand orthostérique (en vert) et d'un modulateur allostérique (en jaune). **(A)** L'agoniste endogène (acétylcholine) vient se fixer dans la pochette de liaison située profondément à l'intérieur des domaines transmembranaires. **(B)** Le modulateur allostérique (iperoxo) vient lui se fixer au niveau des domaines extracellulaires au-dessus du site de liaison orthostérique. Figure adaptée de (Kruse *et al.*, 2014).

Nous avons discuté dans les sections précédentes d'événements moléculaires permettant à un GPCR d'adopter certaines conformations bien spécifiques, conformations qui mèneront à l'activation et à la cascade de signalisation d'effecteurs nécessaire à la réponse biologique (Figure 1). Lorsque l'on regarde ces événements d'un point de vue signalétique, on réalise rapidement le potentiel thérapeutique que pourrait avoir un composé capable d'activer spécifiquement une voie de signalisation par rapport aux autres voies possibles. Dans ce cas-ci, nous parlerons d'allostérie cytosolique (Kenakin et Miller, 2010). Le terme de « sélectivité fonctionnelle » est plus couramment utilisé, notamment dans le cadre de ligands « biaisés », capables de discriminer l'une des différentes voies de signalisation d'un même récepteur. Le cas du récepteur AT₁ illustre bien ce phénomène, son ligand endogène l'angiotensine II peut activer la voie médiée par la protéine G α_q ainsi

qu'une activation de la voie MAPK dépendante de l'action de la β -arrestine 2 (Hunyady et Catt, 2006). Pour sa part, le composé [Sar¹,Ile⁴,Ile⁸]-angiotensine II (SII) n'active que la voie des MAPK via la β -arrestine 2 (Holloway *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003). Il a été démontré que cet agoniste « biaisé » permettrait d'améliorer les fonctions cardiaques ainsi que la survie des cardiomyocytes (Rajagopal *et al.*, 2006). Il a aussi été démontré que la stimulation chronique de la voie $G\alpha_q$ pouvait provoquer à long terme un dysfonctionnement cardiaque (D'Angelo *et al.*, 1997), contrairement à l'activation des voies β -arrestines dépendantes qui démontreraient quant à elles des effets cytoprotecteurs (DeFea *et al.*, 2000; Povsic *et al.*, 2003; Revankar *et al.*, 2004).

Ces exemples démontrent bien le besoin de connaître les signatures conformationnelles des GPCR, dans le but de cibler une réponse précise dans un système cellulaire précis (Wacker *et al.*, 2013). En effet, si chaque GPCR possède un éventail de conformations et de voies de signalisation précises, il serait sensé que le type cellulaire visé par une thérapie, possède lui aussi sa propre signature au niveau des différents partenaires d'interaction et effecteurs d'un GPCR donné.

1.4 Le système urotensinergique

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la liaison des ligands et l'activation de ces GPCR occupe aujourd'hui le devant de la scène scientifique, consacrant notamment les Prs Kobilka et Lefkowitz, avec le prix Nobel de Chimie en 2012. Cependant, la majorité des efforts déployés ont mis l'emphase sur des récepteurs comme la rhodopsine et le β 2-adrénergique, qui ne lient que de très petites molécules. Il existe en effet très peu de GPCR peptidergiques ayant été cristallisés en présence de leur ligand endogène. Ceci étant dû à une masse moléculaire plus élevée de ces ligands peptidiques, ce qui augmente les interactions potentielles entre le ligand et le récepteur, complexifiant ainsi la stabilisation entre ces deux entités. De plus, le rôle précis de ces récepteurs dans des systèmes biologiques demeure très complexe, car chaque système pourrait aussi favoriser des conformations et des activités différentes. Une meilleure compréhension des mécanismes par lequel un ligand peut reconnaître et lier son récepteur peptidergique serait

utile pour développer des molécules plus puissantes, plus sélectives et avec des propriétés pharmacologiques adéquates pour produire les réponses biologiques souhaitées. Parmi ces récepteurs peptidergiques, le récepteur UT illustre très bien cette problématique et nous discuterons plus en détail du système urotensinergique pour ses implications tant au niveau physiologique, que pathologique.

1.4.1 L'Urotensine II

L'urotensine II (UII) fut découverte par le groupe de Bern et Lederis en 1969, chez le poisson téléostéen *Gillichthys mirabilis* (gobie). Ce peptide capable de causer la contraction du muscle lisse, en particulier le rectum de truite, fut isolé à partir d'extraits d'urophyse, une structure neuroendocrine présente uniquement chez le poisson et pouvant s'apparenter à la neurohypophyse des mammifères (Bern et Lederis, 1969). Ce n'est que quelques années plus tard, en 1980, que la séquence peptidique de l'UII de gobie fut déterminée pour la première fois (Pearson *et al.*, 1980). Ce peptide cyclique de 12 acides aminés, semblable à la somatostatine, fut isolé ensuite chez de nombreuses espèces de poissons, ainsi que chez quelques organismes inférieurs. Considérée durant de nombreuses années comme exclusive aux poissons, la détection de l'UII chez la grenouille "*Rana ridibunda*", suggéra à ce moment-là, un rôle chez les espèces supérieures (Conlon *et al.*, 1992). C'est par la suite, à la fin des années 90, que le gène de l'UII fut cloné chez de nombreuses espèces, dont l'homme (Figure 10) (Coulouarn *et al.*, 1998; Coulouarn *et al.*, 1999). Lorsque l'on compare la séquence peptidique de l'UII entre les différentes espèces, on observe une variation de séquence et de longueur pouvant aller de 11 résidus chez l'humain à 17 chez la souris. À l'inverse, la région cyclique C-terminale (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys) est quant à elle strictement conservée chez toutes les espèces (Tableau 1), suggérant son importance pour l'activité du peptide (Vaudry *et al.*, 2010). De nombreuses études de structure-activité ont identifié le pont disulfure reliant les cystéines 5 et 10, ainsi que les résidus Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹ à l'intérieur du cycle de l'UII, comme absolument requise pour l'activité du peptide (Flohr *et al.*, 2002; Kinney *et al.*, 2002; Brkovic *et al.*, 2003; Labarrere *et al.*, 2003; Leprince *et al.*, 2008). Il est intéressant de souligner, que le pont

disulfure, ainsi que le triplet Trp-Lys-Tyr, est une séquence retrouvée aussi chez la somatostatine (Pearson *et al.*, 1980).

Espèces	Sequence
UII	
Lamproie d'eau de mer	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Lamproie d'eau douce	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Fugu	H-Thr-Gly-Asn-Asn-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Raie	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Roussette	H-Asn-Asn-Phe-Ser-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Esturgeon	H-Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Poisson-spatule	H-Gly-Ser-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Gobie	H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Poisson zèbre α	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Poisson zèbre β	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Meunier A	H-Gly-Ser-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Meunier B	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Carpe α	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Carpe $\beta 1$	H-Gly-Gly-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Carpe $\beta 2$	H-Gly-Ser-Asn-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Carpe γ	H-Gly-Gly-Gly-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
Flet	H-Ala-Gly-Thr-Thr-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Truite	H-Gly-Gly-Asn-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Grenouille	H-Ala-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Poulet	H-Gly-Asn-Leu-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Souris	<Gln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
Rat	<Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
Porc A	H-Gly-Pro-Thr-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Porc B	H-Gly-Pro-Pro-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Vache	H-Gly-Pro-Ser-Ser-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Singe	H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Homme	H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
URP	
Poisson zèbre	H-Val-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ser-Gln-Asn-OH
Poulet	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH
Souris	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Rat	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH
Homme	H-Ala-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH

Tableau 1. Comparaison de la séquence de l'UII et de l'URP de différentes espèces.

La portion cyclique conservée de l'UII et de l'URP est encadrée en rouge. Le pont disulfure est illustré en bleu. Tableau adapté de (Leprince *et al.*, 2008)

Chez l'humain, l'UII est d'abord exprimée sous forme de précurseur (Prépro-UII), qui après clivage du peptide signal donnera une proprotéine (proUII), qui va subir une maturation enzymatique afin de générer un peptide cyclique de 11 acides aminés, qui est sa forme pleinement active (Chartrel *et al.*, 2004). Plusieurs études ont démontré que les niveaux les plus élevés d'ARN messager du précurseur d'UII sont retrouvés dans le système nerveux central (Sugo *et al.*, 2003). On retrouve également des niveaux d'ARN messager de proUII dans le cerveau, le cœur, les reins, le foie, l'aorte, le pancréas, la rate,

l'intestin, le côlon, ainsi que dans le placenta (Matsushita *et al.*, 2001; Totsune *et al.*, 2001; Sugo *et al.*, 2003; Totsune *et al.*, 2003). Les enzymes responsables de la maturation des précurseurs, dont la proUll, sont les proprotéines convertases PC1 et PC2 intervenant dans la voie de sécrétion régulée (Bergeron *et al.*, 2000; Seidah *et al.*, 2008; Bilodeau *et al.*, 2011). L'Ull est exprimée de façon très large chez l'humain, et est considérée aujourd'hui comme un régulateur de divers processus physiologiques et semble être impliquée dans diverses pathophysiologies comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose, l'insuffisance rénale et le diabète (Ong *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2010; Vaudry *et al.*, 2010; Chatenet *et al.*, 2013).

1.4.2 L'URP (*Urotensin II-related peptide*)

C'est en 2003, à l'aide d'anticorps dirigés contre la séquence cyclique de l'Ull, qu'a été découvert un nouveau peptide possédant une forte homologie de séquence avec l'Ull. Cet octapeptide cyclique, isolé à partir d'un lysat de cerveau de rat, fut donc nommé *urotensin II-related peptide* (URP) (Sugo *et al.*, 2003). Issu d'un gène différent de celui de l'Ull et subissant sa propre maturation, l'URP ne diffère que d'un seul acide aminé (ACFWKYCV) lorsque l'on compare sa séquence avec celle de l'Ull (Tableau 1). Dans le génome humain, les gènes codants pour l'Ull et l'URP se trouvent respectivement aux positions 1p36 et 3q28. Il est intéressant de noter que ces 2 gènes codent également pour la cortistatine et la somatostatine, les ligands endogènes des récepteurs de la somatostatine, laissant supposer une origine commune de ces ligands, qui seraient issus d'un même gène ancestral (Tostivint *et al.*, 2006). En plus de posséder une architecture cyclique ainsi qu'une séquence quasi identique, l'Ull et l'URP, sont capables d'activer les récepteurs 2 et 5 de la somatostatine en plus d'activer le récepteur UT (Malagon *et al.*, 2008). L'expression de l'URP est très large, tout comme celle de l'Ull (Figure 11), et jusqu'à maintenant on n'a pas trouvé de rôle précis, distinct de celui de l'Ull, pour ce second ligand endogène du récepteur UT (Sugo *et al.*, 2003; Dubessy *et al.*, 2008; Brule *et al.*, 2014).

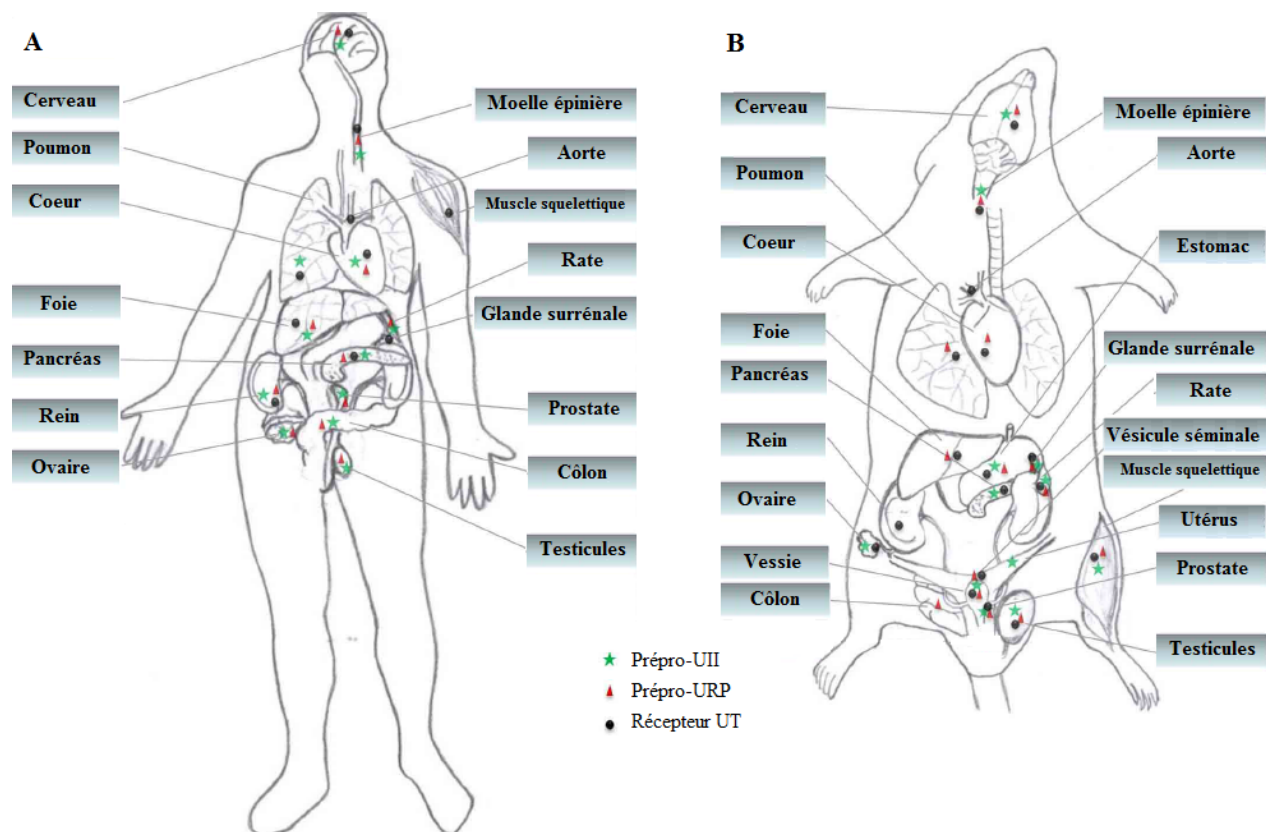


Figure 11. Distribution du système urotensinergique.

Profil d'expression et de distribution centrale et périphérique de la prépro-UUI, du prépro-URP et du récepteur UT chez l'homme et le singe (A) et chez les rongeurs (rat et souris) (B). Figure adaptée de (Chatenet *et al.*, 2013).

1.4.3 Le récepteur UT

Ce n'est qu'une quinzaine d'années après sa découverte chez le poisson, que des effets contractils de l'UUI ont été découverts sur des vaisseaux et des muscles de rongeurs, suggérant ainsi la présence d'un récepteur fonctionnel pour cette substance (Gibson *et al.*, 1986). En 1995, plusieurs GPCR orphelins dont le ligand naturel est inconnu ont été clonés chez le rat, dont le GPR14 qui possédait une homologie avec les récepteurs de la somatostatine et des opiacés (Marchese *et al.*, 1995). Ce n'est qu'en 1999, après avoir mis ce GPR14 en présence d'une banque de plus de 700 molécules, que le groupe d'Ames identifia l'UUI comme étant le ligand endogène de ce GPCR (Ames *et al.*, 1999). Cette découverte fut par ailleurs corroborée cette même année par trois autres groupes (Liu *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1999; Nothacker *et al.*, 1999). L'UUI exerce l'ensemble de ses effets via

le récepteur GPR14, et sa liaison sur ce GPCR est saturable et de haute affinité, c'est ainsi que l'IUPHAR (International Union of basic and clinical PHARmacology) fit renommé le GPR14, récepteur UT (récepteur de l'urotensine II).

Le récepteur UT a été cloné chez plusieurs espèces, dont le chat, le singe, la souris, le rat et l'homme (Ames *et al.*, 1999; Elshourbagy *et al.*, 2002; Behm *et al.*, 2004). Il est composé de 386 acides aminés chez le rat (rUT) et 389 acides aminés chez l'humain (hUT) et fait partie de la superfamille des GPCR de la classe A (Ames *et al.*, 1999). Le récepteur hUT possède une homologie de séquence de 75% avec le récepteur rUT, et de 27% avec le récepteur de la somatostatine SSTR4. Si on compare uniquement les domaines transmembranaires, cette homologie monte à 41%. Lorsque l'on compare le récepteur UT avec d'autres récepteurs peptidergiques de la classe A, on note une faible homologie de séquence, avec par exemple les récepteurs opioïdes μ OR (26%), δ OR (26%) et κ OR (25%) (Proulx *et al.*, 2008). On retrouve chez le récepteur UT plusieurs caractéristiques propres aux GPCR de la classe A, à savoir, un domaine N-terminal relativement court, ainsi qu'un pont disulfure entre le TM3 et la boucle ECL2. Outre les motifs caractéristiques des GPCR comme le motif (D/E)R^(3.50)Y, le motif CWXP^(6.50) et le motif NP^(7.50)xxY (Onan *et al.*, 2004), le récepteur UT possède également deux sites potentiels de glycosylation dans la queue N-terminale aux positions 29 et 33 (Onan *et al.*, 2004). Dans la portion cytoplasmique du récepteur se trouvent des sites putatifs de phosphorylation impliqués dans la désensibilisation du récepteur (Proulx *et al.*, 2008). Le récepteur UT possède une distribution assez large chez l'humain (Figure 11) (Ames *et al.*, 1999; Chatenet *et al.*, 2013). On retrouve ce récepteur au niveau du système nerveux central, dans plusieurs régions du cerveau et de la moelle épinière (Jegou *et al.*, 2006; Chatenet *et al.*, 2013). Le récepteur UT possède également un taux d'expression élevé au niveau des muscles squelettiques, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules endothéliales vasculaires, du myocarde ventriculaire, de l'hypophyse, de la thyroïde, de la glande surrénale et du cortex rénal (Figure 11) (Ames *et al.*, 1999; Maguire *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2008).

1.4.4 Signalisation du récepteur UT

La voie de signalisation majoritairement associée au récepteur UT est celle impliquant la protéine $G\alpha_q$ trimérique. Une fois activé par son ligand, le récepteur UT va changer de conformation et ainsi permettre le recrutement de la sous-unité $G\alpha_q$ couplée au GDP. Le récepteur activé va alors agir comme facteur d'échange de nucléotide guanine, provoquant ainsi le remplacement du GDP en GTP, entraînant le relâchement de la sous-unité α_q -GTP et du dimère $\beta\gamma$. Chacun d'entre eux agira par la suite comme messenger indépendant, activant à leurs tours différents effecteurs intracellulaires (Figure 12). Comme présenté à la section 1.1, la sous-unité $G\alpha_q$ va activer la phospholipase C de type β , permettant ainsi l'hydrolyse du PIP2 en DAG et IP₃. Alors que le DAG activera directement certaines isoformes de la protéine kinase C, l'IP₃ va favoriser l'ouverture de ses récepteurs-canaux (IP₃R), présents à la surface du réticulum endoplasmique, induisant une mobilisation du calcium dans le cytosol de la cellule. Dans la cellule musculaire lisse, le calcium libéré viendra se fixer sur la calmoduline présente dans le milieu intracellulaire, qui viendra activer à son tour la "*myosin light-chain kinase*" (MLCK) par phosphorylation. Cela conduira à une contraction de ces cellules via la phosphorylation des têtes de myosine par la MLCK (Iglewski et Grant, 2010).

Le récepteur UT est également capable d'activer les voies de signalisations associées aux protéines $G\alpha_{i/o}$ trimérique (Ziltener *et al.*, 2002; Brule *et al.*, 2014). Ce couplage va provoquer une inhibition de l'adénylyl cyclase, se traduisant par une diminution des niveaux d'AMPc. On note également une activation de la voie des ERK $\frac{1}{2}$ (*Extracellular signal-Regulated Kinase* $\frac{1}{2}$), ainsi que l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Ziltener *et al.*, 2002; Guidolin *et al.*, 2010; Brule *et al.*, 2014). Le système urotensinergique est également capable de provoquer la vasoconstriction des cellules musculaires lisses via l'activation de la petite GTPase RhoA (*ras homolog gene family, member A*). Cette protéine RhoA peut être activée soit par la PKC via l'effecteur DAG issu du couplage $G\alpha_{q/11}$, ou via l'activation des protéines $G\alpha_{12/13}$ pouvant elles aussi être couplées au récepteur UT (Ziltener *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2005; Brule *et al.*, 2014). L'activation du complexe Rho-A/Rho-kinase par l'UUI, permet donc la contraction, la

réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que la prolifération des muscles lisses vasculaires (Sauzeau *et al.*, 2001).

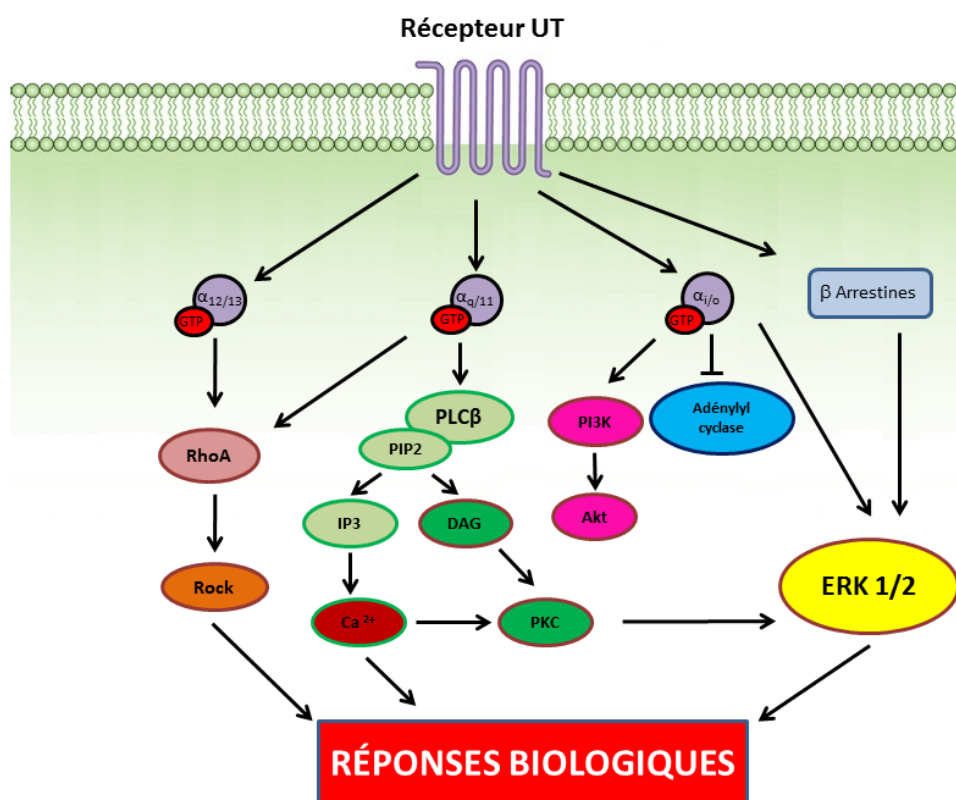


Figure 12. Voies de signalisation intracellulaires classiques du récepteur UT.

Le récepteur UT est reconnu classiquement pour signaler via les protéines $G\alpha_{q/11}$ favorisant la production d'IP₃ et la libération de calcium dans le cytosol. On retrouve également une signalisation via les protéines $G\alpha_{i/o}$ inhibant la production d'AMPc par l'adénylyl cyclase; et via les protéines $G\alpha_{12/13}$ permettant d'activer la GTPase RhoA. Le récepteur va également activer la voie des MAPK via l'activation des PKC ainsi que les voies de signalisations médiées par les β -arrestines.

1.4.5 Actions physiologiques et pathophysiologiques du système urotensinergique

Depuis la découverte du récepteur UT en 1999, de nombreux effets attribuables au système urotensinergique ont été observés, et notamment que l'UII possède un pouvoir vasoconstricteur 10 fois plus puissant que celui de l'endothéline sur l'aorte de rat, faisant de ce peptide le plus puissant vasoconstricteur connu (Ames *et al.*, 1999). Son pouvoir est tel que lorsque l'UII est injectée chez le singe anesthésié, celle-ci provoque une

vasoconstriction artérielle systémique menant à un collapsus circulatoire entraînant la mort de l'animal (Ames *et al.*, 1999). Ces effets spectaculaires de l'administration d'UUI ont donc suscité énormément d'intérêt pour le système urotensinergique et plus particulièrement au niveau du système cardiovasculaire. Néanmoins, très rapidement l'UUI a démontré des effets variables au niveau de ce système, non seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi, d'un tissu à l'autre au sein d'une même espèce, et paradoxalement sur un même tissu (Douglas *et al.*, 2000). En effet, il a été démontré que l'UUI induit une vasoconstriction bien décrite sur l'aorte de rat, cet effet s'opérant sur l'aorte proximale, mais qui va disparaître dans une région plus distale de celle-ci (Douglas *et al.*, 2000). Qui plus est, ces mêmes expériences effectuées sur des aortes de souris ne répondent pas du tout à l'UUI (Douglas *et al.*, 2000). Plus tard, des études ont même démontré que l'injection d'UUI provoque une vasodilatation sur des vaisseaux dont l'endothélium est intact, au lieu d'une vasoconstriction (Hillier *et al.*, 2001; Stirrat *et al.*, 2001). Néanmoins, il est possible de retrouver cet effet contractile en dénudant ces vaisseaux des cellules endothéliales ainsi qu'en inhibant la synthèse d'oxyde nitrique (NO) (MacLean *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2000). À la vue de l'ensemble de ces effets, on peut spéculer que l'UUI serait un médiateur physiologique important du tonus vasculaire et de la pression artérielle chez l'humain, mais son effet exact au niveau cardiovasculaire reste difficile à interpréter pour l'instant.

Le système urotensinergique est également présent au niveau du système rénal (Figure 11). Il faut noter que le rein est une source majeure d'UUI plasmatique et urinaire chez le mammifère; la présence d'UUI au niveau du tubule distal suggère donc un rôle de cette hormone au niveau de la régulation du taux de filtration glomérulaire (Ashton, 2006; Langham et Kelly, 2013). En effet, la présence d'UUI dans l'artère rénale de rat anesthésié cause des augmentations de flux sanguin et du taux de filtration glomérulaire au niveau rénal (Shenouda *et al.*, 2002); ces effets pouvant également être bloqués par l'inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique (Zhang *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'UUI et le récepteur UT sont surexprimés au niveau des cellules inflammatoires dans les lésions athérosclérotiques (Bousette *et al.*, 2004), suggérant là aussi un rôle du système urotensinergique au sein du système immunitaire. Le récepteur UT est également exprimé

chez les monocytes et il a été montré que l'UUI agissait comme un facteur chimiotactique chez ces cellules (Segain *et al.*, 2007).

On retrouve également le système urotensinergique dans les neurones moteurs, la moelle épinière et le cerveau, suggérant un rôle potentiel de l'UUI dans le système nerveux central (Figure 11). L'administration intra-cérébro-ventriculaire (ICV) d'UUI provoque une réponse via l'activation du système nerveux sympathique, menant à une tachycardie (Lin, *et al.*, 2003a; Lin *et al.*, 2003b). Chez la brebis consciente, l'administration ICV d'UUI provoque la sécrétion d'ACTH et d'adrénaline via la stimulation de l'axe médullaire hypothalamo-hypophysaire. Cette stimulation s'accompagne d'effets chronotropes et ionotropes positifs sur le cœur, d'une hausse de pression artérielle, d'une vasodilatation périphérique et d'une hyperglycémie (Watson *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent donc que l'UUI serait impliquée dans les mécanismes de réponse aux stimuli d'alerte ou de stress. Chez le rat, l'injection d'UUI dans le noyau tegmental pédonculopontin (PPT), une région du cerveau impliquée dans le contrôle du sommeil paradoxal chez les mammifères, augmente l'activité des neurones cholinergiques qui altèrent les périodes de sommeil paradoxal, indiquant un rôle potentiel de l'UUI dans la régulation du cycle d'éveil/sommeil (Huitron-Resendiz *et al.*, 2005).

Dans le cadre de l'implication physiopathologique du système urotensinergique, on se rend compte que l'UUI est impliquée dans de nombreuses pathologies et notamment dans les maladies cardiovasculaires et certains cancers (Franco *et al.*, 2014; Federico *et al.*, 2014). Dans le cas de patients atteints d'hypertension, on peut retrouver une augmentation de l'expression de UUI et de son récepteur d'un facteur 3 (Suguro *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de l'UUI et UT semble être également associée à l'athérosclérose coronarienne (Maguire *et al.*, 2004). Il a même été démontré récemment une surexpression du récepteur UT dans un modèle murin d'athérosclérose, et qu'un traitement de ces souris par un antagoniste de ce récepteur diminuait la formation des plaques d'athérome (You *et al.*, 2012). L'UUI semblerait également jouer un rôle dans la sécrétion de l'insuline et donc dans la pathogenèse du diabète. En effet, le système urotensinergique est exprimé au niveau du pancréas (Figure 11), et il a été démontré que

l'Ull est capable d'inhiber de façon significative la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la concentration en glucose, ceci en agissant directement via les cellules β du pancréas (Clozel *et al.*, 2006). Récemment, un rôle proangiogénique du système urotensinergique a été démontré, notamment à travers l'activation de la voie MAPK et de la PI3K (Guidolin *et al.*, 2010a; Guidolin *et al.*, 2010b). Ces différentes voies de signalisation constituent donc des cibles intéressantes en vue d'un traitement ciblant l'angiogenèse au niveau des pathologies cardiovasculaires, de l'inflammation, ou encore des cancers présentant des niveaux d'Ull/UT élevés (Diebold *et al.*, 2012). De plus, chez des patients souffrant de maladies tels que l'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'hypertension causée par la cirrhose du foie, l'insuffisance rénale et le diabète, les niveaux circulants d'Ull sont plus élevés que chez les individus sains (Ong *et al.*, 2005). Toutes ces observations portent à croire que le système urotensinergique est impliqué dans ces maladies. Cependant, il reste à clarifier que l'élévation d'Ull est une cause ou une conséquence du développement de ces maladies.

1.5. Hypothèse et objectifs de l'étude

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent une famille de protéines responsables d'un très grand nombre de réponses cellulaires. Le mécanisme de liaison et de transition du récepteur vers sa forme active demeure un phénomène encore peu compris, surtout en ce qui concerne les récepteurs peptidergiques. On compte très peu d'informations au sujet de l'organisation structurale de la pochette de liaison du récepteur UT, et il n'existe pas de structure moléculaire complète du récepteur UT validée expérimentalement. Il apparaît donc nécessaire de collecter des informations autour du mode de liaison des ligands de ce récepteur UT, ainsi que sur le mécanisme d'activation de ce GPCR. Nous tenterons au travers de nos différents objectifs d'identifier ces déterminants moléculaires qui contribuent à la formation et au fonctionnement de la pochette de liaison du récepteur UT.

Hypothèse de recherche

Le récepteur UT possède au sein de sa structure, un ensemble de déterminants moléculaires responsables de la liaison de l'UUI et de son activation, qui sont peu caractérisés. Nous posons comme hypothèse que ces domaines précis d'interaction avec l'UUI peuvent être identifiés au sein du récepteur UT et notre objectif sera donc d'identifier les déterminants moléculaires composant la pochette de liaison du récepteur UT et ensuite de les comparer avec les autres GPCR de la classe A.

Objectif 1 : Identification des résidus constituant la pochette de liaison du récepteur UT.

Nous identifierons les déterminants moléculaires impliqués directement dans la pochette de liaison à l'aide de la méthode de SCAM (*Substituted cysteine accessibility method*). Nous effectuerons la substitution individuelle par un résidu cystéine de chaque acide aminé compris dans les régions des TM1, TM2, TM3, TM4 et TM5 pour mesurer si l'alkylation de ces résidus cystéines obstrue la liaison du ligand. Ceci nous permettra de déterminer le patron des acides aminés de ces régions qui compose la pochette de liaison (Sainsily *et al.*, 2013; Sainsily *et al.*, 2014).

Objectif 2 : Proposition d'un modèle moléculaire du récepteur UT en complexe avec l'urotensine II.

L'ensemble de mes travaux permet de proposer un modèle moléculaire complet de la pochette de liaison du récepteur UT. Ce modèle nous permet de visualiser les interactions moléculaires impliquées dans la liaison de l'UUI à son récepteur et d'émettre des hypothèses sur les mécanismes d'activation du récepteur UT. De façon plus générale, cette étude apporte des informations quant à la liaison des hormones peptidiques avec leurs récepteurs respectifs. L'objectif ultime de cette recherche est de proposer un outil de modélisation pharmacologique du récepteur UT, qui nous permettra de développer de nouveaux ligands aux propriétés de signalisation désirées (Sainsily *et al.*, 2013; Sainsily *et al.*, 2014).

ARTICLE 1

Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin II receptor

Auteurs de l'article: Xavier Sainsily, Jérôme Cabana, Philip E. Boulais, Brian J. Holleran, Pierre Lavigne, Emanuel Escher, and Richard Leduc

Statut de l'article: Publié dans *Biochem. Pharmacol.* (2013); 86(11), 1584-1593

Avant-propos: J'ai contribué à cet article en effectuant toutes les manipulations expérimentales à l'exception de la modélisation moléculaire. J'ai contribué à la conception du projet et à l'écriture du manuscrit.

Résumé : L'urotensine II (UII) est un peptide cyclique de 11 acides aminés qui se lie spécifiquement au récepteur de l'urotensine II (récepteur UT). Ce récepteur couplé aux protéines-G est impliqué dans le système cardiovasculaire et est associé à plusieurs conditions pathophysiologiques comme l'hypertension, l'athérosclérose, crise cardiaque, hypertension artérielle pulmonaire et bien d'autres. Afin d'identifier les résidus spécifiques des domaines transmembranaires (TM) trois (TM3), quatre (TM4) et cinq (TM5) qui sont impliqués dans la formation de la pochette de liaison du récepteur UT, nous avons utilisé la méthode de SCAM (*Substituted-cysteine accessibility method*). Chaque résidu des TM3 (F118^(3.20) à S146^(3.48)), TM4 (L168^(4.44) à G194^(4.70)) et TM5 (W203^(5.30) à V232^(5.59)), a été muté individuellement en une cystéine. Les mutants obtenus ont ensuite été exprimés dans des cellules COS-7 et traités avec l'agent S-alkylant MTSEA, sous sa forme d'hydrobromure. Le traitement au MTSEA provoque une diminution significative de la capacité de liaison d'[¹²⁵I]UII pour les mutants L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) et M134C^(3.36) du TM3 et les mutants M184C^(4.60) et I188C^(4.64) du TM4. Aucune perte de liaison n'a été observée suite au traitement au MTSEA de l'ensemble des mutants du TM5 testés. En l'absence de structure cristalline du récepteur UT, ces résultats nous permettent d'identifier les déterminants clés dans les TM3, TM4 et TM5 participant à la formation de la pochette de liaison du récepteur UT, et d'ainsi de proposer un modèle par homologie du récepteur UT.

Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor

Xavier Sainsily, Jérôme Cabana, Philip E. Boulais, Brian J. Holleran, Emanuel Escher, Pierre Lavigne and Richard Leduc[#]

Department of Pharmacology, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H5N4

Running title: Identification of TM3, TM4 and TM5 residues of the UT receptor binding pocket

[#]Corresponding author

Richard Leduc, Ph.D.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec

Canada J1H 5N4

Tel.: ;

Fax: ;

E-mail:

ABSTRACT

Urotensin-II (UII), a cyclic undecapeptide, selectively binds the urotensin-II receptor (UT receptor), a G protein-coupled receptor (GPCR) involved in cardiovascular effects and associated with numerous pathophysiological conditions including hypertension, atherosclerosis, heart failure, pulmonary hypertension and others. In order to identify specific residues in transmembrane domains (TM) three (TM3), four (TM4) and five (TM5) that are involved in the formation of the UT receptor binding pocket, we used the substituted-cysteine accessibility method (SCAM). Each residue in the F118^(3.20) to S146^(3.48) fragment of TM3, the L168^(4.44) to G194^(4.70) fragment of TM4 and the W203^(5.30) to V232^(5.59) fragment of TM5, was mutated, individually, to a cysteine. The resulting mutants were then expressed in COS-7 cells and subsequently treated with the positively charged sulfhydryl-specific alkylating agent methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA). MTSEA treatment resulted in a significant reduction in the binding of ¹²⁵I-UII to TM3 mutants L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) and M134C^(3.36) and TM4 mutants M184C^(4.60) and I188C^(4.64). No loss of binding was detected following treatment by MTSEA for all TM5 mutants tested. In absence of a crystal structure of UT receptor, these results identify key determinants in TM3, TM4 and TM5 that participate in the formation of the UT receptor binding pocket and has led us to propose a homology model of the UT receptor.

Keywords: Urotensin-II, G protein-coupled receptor, UT receptor, Substituted-cysteine accessibility method, molecular model.

1. INTRODUCTION

Urotensin-II (Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val, UII) is a cyclic undecapeptide described as the most potent vasoconstrictor identified in mammals, firstly isolated from the caudal neurosecretory system of the Teleost fish [1]. UII signals through the urotensin-II receptor (UT receptor) detected in the central nervous system and widely expressed in human tissues, including the left atrium and ventricle of the heart, smooth muscle cells of the coronary artery and aorta, as well as endothelial cells from several vascular beds [2]. The UII/UT receptor system is considered as a pharmacological target in the pathophysiology of hypertension, heart failure, and cardiac fibrosis and hypertrophy [3,4]. The UT receptor is a member of family 'A' of the larger G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily [2]. Many features associated with this family such as a short N-terminus, a highly conserved residue in each transmembrane domain (TM), a D/ERY motif in the second intracellular loop, a CW/FxP 'toggle switch' motif [5] in TM6, a NPxxY motif in TM7, and potential serine/threonine phosphorylation sites in the cytoplasmic tail are found in the UT receptor [6].

The molecular mechanisms by which agonists bind to and activate GPCRs through conformational changes are not completely understood. Although for many years, the only available structural model of a GPCR was rhodopsin [7], recently the three-dimensional structures of other GPCRs such as the β adrenergic receptors [8,9], adenosine A_{2A} receptor [10], chemokine CXCR4 receptor [11], and opioid receptors [12-14] have been determined. These studies have enabled a better understanding of how diffusible ligands can recognize and interact with residues of the binding pocket of GPCRs.

Despite these major advances, many questions remain regarding the subtle variations found in different GPCR binding pockets. Hence, a variety of biophysical and biochemical approaches are needed to identify those key determinants that make-up the binding cavity. The substituted-cysteine accessibility method (SCAM) [15-17] is an ingenious approach for systematically identifying TM residues that contribute to

the formation of the binding-site pocket of GPCRs. In this approach, consecutive residues within TMs are mutated to cysteine, one at a time, and the mutant receptors are expressed in heterologous cells. If ligand binding to a cysteine-substituted mutant is unchanged compared to wild-type receptor, it is assumed that the structure of the mutant receptor, especially around the binding site, is similar to that of the wild-type receptor and that the substituted cysteine lies in an orientation similar to that of the residue of the wild-type receptor. In TMs, the sulfhydryls of cysteines oriented toward the aqueous binding-site pocket should react more quickly with charged sulfhydryl reagents like methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA) than the sulfhydryls of cysteines that face the interior of the protein or the lipid bilayer. Two criteria are used to determine whether engineered cysteines are positioned at the surface of the binding-site pocket: (i) the reaction with the MTSEA reagent alters binding irreversibly and (ii) the reaction is retarded by the presence of the ligand. This approach has been used by us and others to identify residues that line the surface of GPCR binding-site pockets [18-24]. Indeed, using SCAM analysis, we have previously identified five MTSEA-sensitive residues in TM6 and TM7 of the rat UT receptor (rUT receptor) [23]. In this study, we report the application of SCAM to probe TM3, TM4 and TM5 of the rUT receptor.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Bovine serum albumin (BSA) and bacitracin were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). X-tremeGENE HP transfection reagent was from Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA). The sulfhydryl-specific alkylating reagent MTSEA ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) was from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), and penicillin/streptomycin were from Wisent Bioproduct (St-Bruno, QC, Canada). Oligonucleotide primers were from IDT (Coralville, IA, USA). Human UII was from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). ^{125}I -UII (specific activity 1000 Ci/mmol) was prepared using IODO-GEN (1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenyl-glycoluril; Thermo Scientific Pierce, Nepean, ON, Canada) as described by Fraker and Speck [25]. Briefly, 10 μl of a 1 mM peptide solution was incubated with 20 μg of IODO-GEN, 80 μl of 100 mM borate buffer (pH 8.5), and 1mCi of $\text{Na-}^{125}\text{I}$ for 30 min at room temperature, and was then purified by reversed-phase HPLC on a C-18 column. The specific radioactivity of the labelled peptide was determined by self-displacement and saturation-binding analysis.

2.2 Numbering of residues

Residues in TM3, TM4 and TM5 of the rUT receptor were given two numbering schemes. First, residues were numbered according to their positions in the rUT receptor sequence. Second, residues were also indexed according to their position relative to the most conserved residue in each TM in which they are located [26]. By definition, the most conserved residue was assigned the position index "50" e.g. in TM5, P223 is the most conserved residue and was designated P223^(5,50), whereas the upstream residue was designated G222^(4,49) and the downstream residue G224^(4,51).

2.3 PCR mutagenesis

Mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La

Jolla, CA, USA) using rUT subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3.1 as a template. A set of forward and reverse oligonucleotides were synthesized to introduce cysteine mutations between F118^(3.20) and S146^(3.48) for TM3, between L168^(4.44) and G194^(4.70) for TM4 and between W203^(5.30) and V232^(5.59) for TM5, and the mutations were confirmed by nucleotide sequencing.

2.4 Cell culture

COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% (vol/vol) fetal bovine serum, 100 IU/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin at 37°C. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using XtremeGENE HP as described by the manufacturer. Transfected cells were used 24h post-transfection for binding and 48h post-transfection for SCAM assays.

2.5 Binding experiments

COS-7 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were gently scraped into washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂), centrifuged at 2500g for 15 min at 4°C, and resuspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 0.01% bacitracin). Saturation binding experiments were performed by incubating broken cells (4-10 µg of protein) for 1h at room temperature with increasing concentrations of ¹²⁵I-UII (0.15-20 nM) in a final volume of 200 µl. Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM unlabeled UII. Bound radioactivity separated from free ligand by filtration through glass fiber filter plates (Millipore, MA, Billerica,) and washed 3 times with 200 µL of ice-cold washing buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ-radiation counting. Results are presented as means ± SD. Binding data (B_{max} and K_d) were analyzed with GraphPad Prism version 6 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using a one-site binding hyperbola nonlinear regression analysis.

2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

COS-7 cells were seeded in 24-well plates at 30 000 cells/well. 48h post-transfection, cells were fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde/Tris-buffered saline (TBS) (20mM Tris-HCl pH 7.5 and 150mM NaCl) for 5 minutes at room temperature. Cells were then washed twice with TBS and incubated 30 min with TBS containing 1% BSA at room temperature to block non-specific binding. A mouse monoclonal anti-c-Myc (clone 9E10, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) was added at a dilution of 1:5000 in TBS-BSA 1% for 60 min. Following the incubation with the primary antibody, cells were washed twice with TBS and anti-mouse IgG-peroxydase antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was then added at a dilution of 1:10000 in TBS-BSA 1% for 60 min. Following the incubation with the secondary antibody, cells were washed twice with TBS and 250 μ L of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (T0440, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was added. The plates were incubated at room temperature and the reaction was stopped using 250 μ L of HCl 2N. 200 μ L of the colorimetric reaction was transferred to a 96-well plate and the absorbance was measured at 450 nm. Cells transfected with empty vector (pcDNA3.1) were used to determine background.

2.7 Treatment with MTSEA reagents

MTS treatments were performed according to the procedure of Javitch *et al.*, [16] with minor modifications. Two days after transfection, cells, which were grown in 12-well plates, were washed with PBS and incubated for 3 min at room temperature with freshly prepared MTSEA at the desired concentrations (0.5 mM to 2 mM) in a final volume of 200 μ l. The reaction was stopped by washing the cells with ice-cold PBS. Intact cells were then incubated in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM 125 I-UII for 90 min at room temperature. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed with 0.1N NaOH and the radioactivity was evaluated by γ -radiation counting. The percentage of fractional binding inhibition was calculated as $[1 - (\text{specific binding after MTSEA treatment} / \text{specific binding without treatment})] \times 100$.

2.8 Protection against MTSEA by UII

Transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and incubated in the presence or absence of 100 nM UII for 1h at 16°C (to avoid internalization of receptors). Cells were washed to remove excess ligand and were treated with the MTSEA reagent. Cells were washed three times with ice-cold PBS and once with an acidic buffer (150 mM NaCl, 50 mM acetic acid, pH 3.0) to dissociate bound ligand. They were then incubated for 3h at 16°C in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM ¹²⁵I-UII. The percentage of protection was calculated as [(inhibition in the absence of UII) – (inhibition in the presence of UII)]/(inhibition in the absence of UII) x 100.

2.9 IP-One HTRF

Measurement of myo-inositol-1-phosphate (IP₁) accumulation in COS-7 cells was performed using the IP-One HTRF assay (Terbium) kit as described by Cisbio (Bedford, MA, USA). Briefly, transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and transferred into 384-well cell plates (Perkin Elmer; Waltham, MA, USA; 12500 cells/well). Basal (vehicle) and stimulated (1μM UII) IP₁ production assay was performed using IP-One HTRF assay following manufacturer's instructions. FRET fluorescence readouts were performed with a Tecan Infinite M1000 premium Quad4 Monochromator.

2.10 Molecular modeling

The I-TASSER server [27,28] was used to generate a multiple-template homology model of rUT from its primary structure (UT2R GenBank™ accession no. P49684). The top templates used by I-TASSER were the substance-P receptor (PDB: 2KS9), the human A2A adenosine receptor (PDB: 3EML), the N/OFQ opioid receptor (PDB: 4EA3), the human kappa opioid receptor (PDB: 4DJH) and the sphingosine-1-phosphate receptor (PDB: 3V2Y). Out of the top five models predicted by I-TASSER, we selected the model that was the most appropriate to allow the insertion of UII in the UT binding pocket (Model #2, C-score = -2.49). Previous modeling done by us was used as the basis for the initial UII peptide orientation

within the binding pocket [23,29]. The GROMACS software suite [30] was used with the OPLS/AA forcefield [31-33] and GBSA implicit solvent model [34] to perform potential energy minimization and a molecular dynamic simulation of the UII/rUT receptor complex. Distance restraints based on previous photolabeling results [29,35] were used to guide and orient UII docking inside the binding pocket. The distance restraints were implemented in the topology file using $r_0 = 0\text{\AA}$, $r_1 = 7\text{\AA}$ and $r_2 = 12\text{\AA}$ between the $C\beta$ atoms of the corresponding residues, with a force constant of 3000 kJ/mol/nm^2 . More specifically, restraints between residue E1 (UII) and M288 (rUT receptor), residue F6 (UII) and M184 and M185 (rUT receptor), and residue K8 (UII) and D130 (rUT receptor) were used. The backbone heavy atoms of the rUT receptor TMs were restrained with a force constant of 1000 kJ/mol/nm^2 . The UII peptide, the intra and extra-cellular loops, the N- and C-terminal regions and the side chains of rUT receptor were unrestrained and free to move. The OPLS/AA forcefield with the GBSA implicit solvent model was used. Energy minimization was performed using one step of steepest descent algorithm every 100 steps of conjugate gradient algorithm, until the derivative reached machine precision ($E_{\text{pot}} = -6.77\text{e}+04\text{ kJ/mol}$ and $F_{\text{max}} = 3.61\text{e}+02\text{ kJ/mol/nm}$). This was followed by a short 500 ps molecular dynamics simulation during which the system is gradually heated to 310 K over the first 100 ps of the simulation. The final frame of the MD trajectory was energy minimized and analyzed using ProCheck [36]. The results indicated that 97.2% of the residues were in the “most favoured” and “additional allowed” regions. Images were produced with PyMOL. RMSD calculations were performed with the “fit” command in PyMOL. The N- and C-terminal parts of the rUT receptor (before TM1 and after TM7) were not considered in RMSD calculations because of their highly unstructured nature in the rUT receptor homology model.

3. RESULTS

3.1 Binding properties of mutant receptors with cysteines in TM3, TM4 and TM5

To identify residues in TM3, TM4 and TM5 that face the binding-site pocket of the rUT receptor, we mutated 28 consecutive residues between F118^(3.20) and S146^(3.48) of TM3, 27 consecutive residues between L168^(4.44) and G194^(4.70) of TM4 and 30 consecutive residues between W203^(5.30) and V232^(5.59) of TM5 to cysteine, one at a time (Fig. 1). Each mutant receptor was transiently expressed in COS-7 cells. To assess the conservation of the overall conformation of these receptors after the substitutions, the pharmacological parameters of the equilibrium binding of the radiolabeled ligand ¹²⁵I-UII (K_d and B_{max}) were determined (Tables 1, 2 and 3).

Most mutant receptors exhibited binding affinities for ¹²⁵I-UII, similar to that of the wild-type rUT receptor. TM3 mutants F118C^(3.20), G119C^(3.21), D120C^(3.22), G122C^(3.24), R124C^(3.26), D130C^(3.32), and F139C^(3.41), TM4 mutants W174C^(4.50), A177C^(4.53), P183C^(4.59), and G194C^(4.70) and TM5 mutants W203C^(5.30), H208C^(5.35), Y211C^(5.38), T218C^(5.45) and P223C^(5.50) did not demonstrate any detectable binding activity and were not used for the SCAM analyses. With the exception of D130C^(3.32), ELISA showed reduced cell surface expression for all of these receptor mutants (Fig. 2).

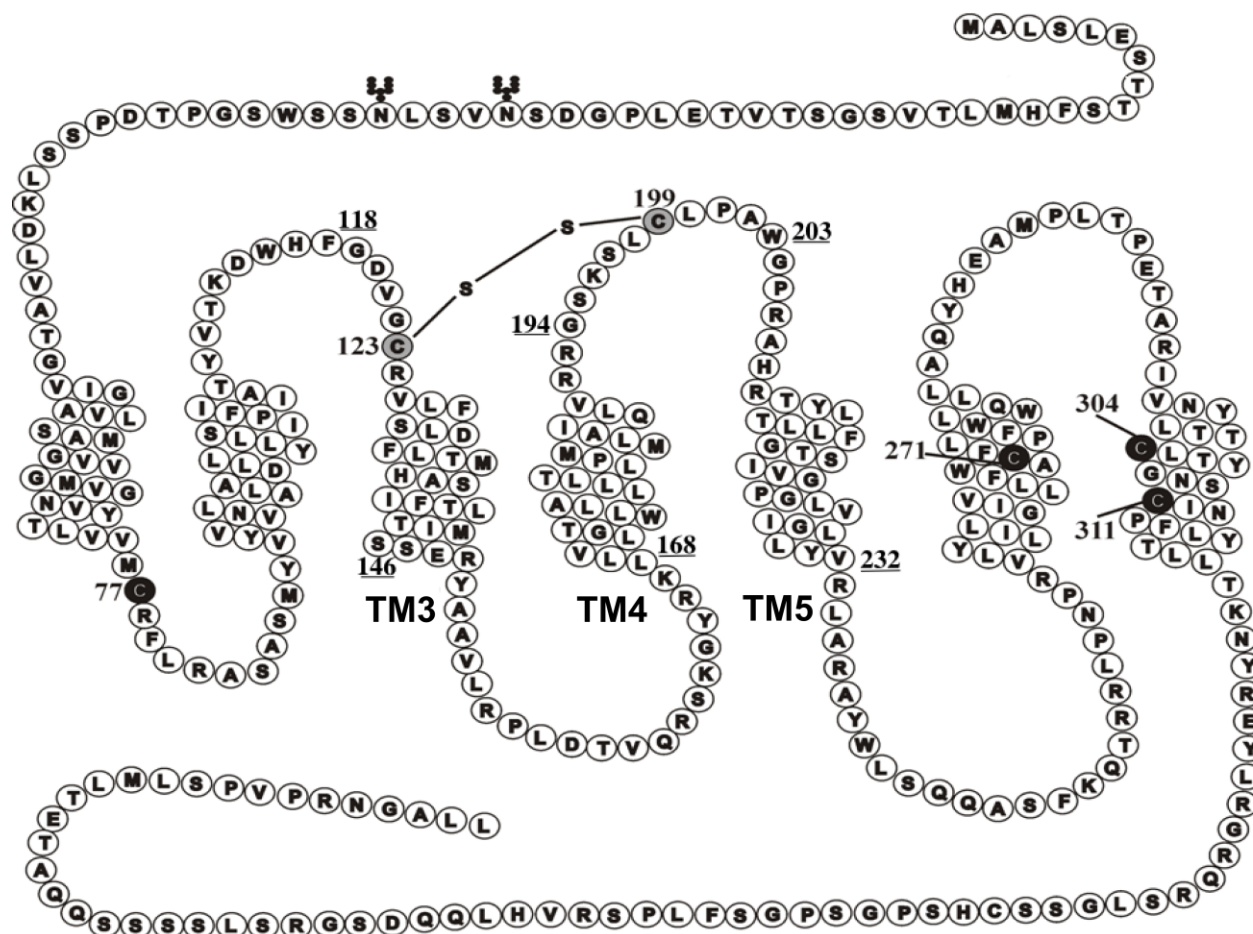


Fig. 1. Schematic representation of the rUT receptor. The numbers indicate the position of cysteines and other residues in the receptor. The grey closed circles represent cysteines that are thought to be linked via disulfide bridges, and the black closed circles represent cysteines whose side chains do not form a disulfide bridge. Mutated TM3 residues are located between F118^(3.20) and S146^(3.48) inclusively. Mutated TM4 residues are located between L168^(4.44) and G194^(4.70) inclusively. Mutated TM5 residues are located between W203^(5.30) and V232^(5.59) inclusively. Putative N-glycosylation sites (N29, N33) are indicated.

Table 1. Binding properties of UH to cysteine-substituted rUT TM3 mutant receptors

Mutants	Kd (nM)	B_{max} (pmol / mg protein)
rUT (WT)	2,9 ± 0,9	12,7 ± 9,1
F118C	NDB	NDB
G119C	NDB	NDB
D120C	NDB	NDB
V121C	2,6 ± 1,1	2,6 ± 1,9
G122C	NDB	NDB
R124C	NDB	NDB
V125C	2,6 ± 0,4	3,9 ± 1,5
L126C	19,8 ± 1,7	3,1 ± 1,5
F127C	14,5 ± 5,3	5,7 ± 1,1
S128C	2,3 ± 1,4	2,9 ± 3,3
L129C	2,5 ± 0,4	2,4 ± 2,3
D130C	NDB	NDB
F131C	1,4 ± 0,6	6,9 ± 3,1
L132C	1,3 ± 0,5	1,8 ± 0,7
T133C	3,5 ± 0,7	5,4 ± 1,5
M134C	4,5 ± 1,6	2,7 ± 0,7
H135C	1,1 ± 0,9	3,1 ± 2,9
A136C	2,4 ± 1,3	3,9 ± 3,1
S137C	1,8 ± 0,5	1,5 ± 0,6
I138C	0,9 ± 0,5	0,6 ± 0,1
F139C	NDB	NDB
T140C	2,9 ± 1,2	0,9 ± 0,1
L141C	5,3 ± 4,8	2,8 ± 0,8
T142C	4,2 ± 0,2	5,9 ± 3,9
I143C	1,9 ± 0,7	2,6 ± 1,2
M144C	3,9 ± 1,8	1,2 ± 0,2
S145C	2,5 ± 0,4	7,5 ± 1,2
S146C	3,5 ± 1,2	9,2 ± 5,1

Cell transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Materials and Methods. Binding affinities (Kd) and maximal binding capacities (Bmax) are expressed as the means ± SD of values obtained from at least three independent experiments performed in duplicate. Mutant F118C, G119C, D120C, G122C, R124C, D130C, and F139C did not exhibit any detectable binding (NDB = No Detectable Binding). Residues in bold indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment.

Table 2. Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM4 mutant receptors

Mutants	Kd (nM)	B_{max} (pmol / mg protein)
rUT (WT)	2,9 ± 0,9	12,7 ± 9,1
G194C	NDB	NDB
R193C	6,2 ± 1,5	1,9 ± 0,8
R192C	7,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
V191C	2,4 ± 0,6	1,8 ± 1,4
L190C	2,9 ± 0,2	4,6 ± 3,2
Q189C	3,2 ± 0,1	2,6 ± 1,0
I188C	9,9 ± 2,9	5,5 ± 3,1
A187C	3,9 ± 0,6	2,9 ± 1,7
L186C	6,6 ± 3,8	0,5 ± 0,3
M185C	1,8 ± 1,4	1,1 ± 0,1
M184C	5,6 ± 1,8	0,7 ± 0,1
P183C	NDB	NDB
L182C	7,3 ± 2,9	1,5 ± 1,2
T181C	5,6 ± 1,8	1 ± 0,1
L180C	4,9 ± 4,3	0,6 ± 0,3
L179C	2,5 ± 0,6	0,4 ± 0,1
L178C	4 ± 2,3	3,7 ± 1,2
A177C	NDB	NDB
L176C	6,4 ± 1,8	0,9 ± 0,2
L175C	3,4 ± 2,2	0,6 ± 0,1
W174C	NDB	NDB
T173C	4,5 ± 1,4	7,3 ± 0,1
G172C	7,1 ± 6,3	1,3 ± 0,1
L171C	3,3 ± 0,7	1,4 ± 0,2
V170C	5,9 ± 1,1	1,8 ± 0,9
L169C	2,9 ± 0,9	0,9 ± 0,5
L168C	3,2 ± 1,3	0,4 ± 0,1

Cells transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Materials and Methods. Binding affinities (Kd) and maximal binding capacities (Bmax) are expressed as the means ± SD of values obtained in n from at least three independent experiments performed in duplicate. Mutant W174C, A177C, P183C and G194C did not exhibit any detectable binding (NDB = No Detectable Binding). Residues in bold indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment.

Table 3. Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM5 mutant receptors

Mutants	Kd (nM)	Bmax (pmol / mg protein)
rUT (WT)	2,9 ± 0,9	12,7 ± 9,1
W203C	NDB	NDB
G204C	5,2 ± 2,2	2,4 ± 5,2
P205C	4,1 ± 2,3	1,5 ± 0,4
R206C	3,9 ± 0,4	2,4 ± 1,2
A207C	5,1 ± 2,1	2,9 ± 2,6
H208C	NDB	NDB
R209C	5,5 ± 1,5	4,1 ± 2,4
T210C	3,2 ± 0,4	6,5 ± 5,7
Y211C	NDB	NDB
L212C	4,4 ± 0,3	1,4 ± 1,2
T213C	11,1 ± 1,7	7,6 ± 5,3
L214C	2,9 ± 0,9	5,1 ± 4,3
L215C	2,2 ± 0,6	3,5 ± 2,8
F216C	7,1 ± 5,9	1,6 ± 0,9
G217C	3,7 ± 0,6	8,6 ± 0,8
T218C	NDB	NDB
S219C	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,9
I220C	1,7 ± 0,4	3,1 ± 2,5
V221C	2,1 ± 0,2	4,7 ± 4,5
G222C	2,8 ± 0,5	7 ± 5,5
P223C	NDB	NDB
G224C	4,6 ± 0,9	2,2 ± 0,6
L225C	2,7 ± 0,1	6,1 ± 0,7
V226C	2,1 ± 0,4	4,9 ± 2,3
I227C	5,7 ± 3,5	1,7 ± 0,5
G228C	5,8 ± 3,1	3,3 ± 1,8
L229C	2,9 ± 0,2	8,8 ± 6,8
L230C	2,1 ± 0,8	4,7 ± 0,3
Y231C	2,8 ± 0,4	3,6 ± 0,6
V232C	2,1 ± 0,4	8,6 ± 1,9

Cell transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Materials and Methods. Binding affinities (Kd) and maximal binding capacities (Bmax) are expressed as the means ± SD of values obtained in from at least three independent experiments performed in duplicate. Mutant W203C, H208C, Y211C, T218C and P223C did not exhibit any detectable binding (NDB = No Detectable Binding).

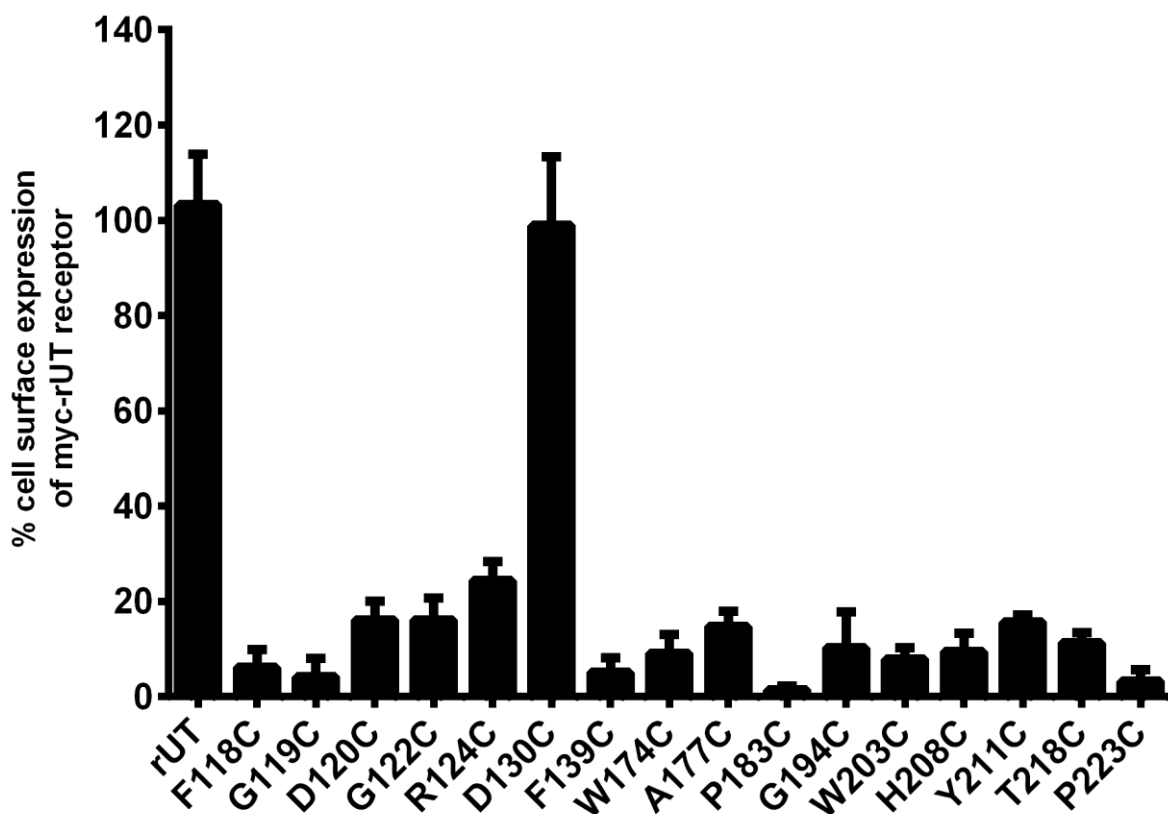


Fig. 2. Cell surface expression of rUT receptor mutants. Cell surface expression was measured by ELISA (as described under Materials and Methods) in COS-7 cells transiently expressing myc-rUT receptor mutants that were not detected in binding experiments. The results are shown as the percentage of cell surface receptor expression of the wild-type myc-rUT receptor (100%). Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

3.2 Effect of MTSEA treatment on the binding properties of TM3, TM4 and TM5 mutant receptors

To verify whether the reporter cysteines introduced into either TM3, TM4 or TM5 were oriented toward the rUT receptor binding pocket, cells expressing rUT mutant receptors were treated with 0.5 mM to 2 mM MTSEA for 3 min. It had been already demonstrated that the six endogenous cysteine residues of rUT receptor (Fig. 1) were not involved in making rUT receptor sensitive to MTSEA treatment when binding of UII was used to evaluate a potential effect [23]. For TM3 mutants, treatment with 0.5 mM MTSEA revealed that three mutants L126C^(3.28), F127C^(3.29) and F131C^(3.33) showed binding inhibitions of 98%, 42% and 37% respectively (Fig. 3). At 2 mM MTSEA, the binding property of an additional mutant, M134C^(3.36), was significantly inhibited by 49% (Fig. 3). For TM4 mutants, treatment with 0.5 mM MTSEA revealed that two mutants: M184C^(4.60) and I188C^(4.64) showed binding inhibitions of 43% and 86% respectively (Fig. 4). Following MTSEA treatment, the binding properties of all other TM3 and TM4 mutant receptors were not significantly affected. For TM5 mutants, Fig.5 shows that no loss of binding was detected following treatment by MTSEA for every mutant receptor tested.

3.3 Protection against MTSEA reagent by a pre-treatment with UII

To confirm that reporter cysteines accessible to MTSEA were indeed located within the binding pocket of the rUT receptor, mutants were incubated with the competitive ligand, UII, prior to MTSEA treatment. Cells were then washed with an acid buffer to dissociate the bound ligand, and the receptors were assayed for binding with the radiolabeled competitive ligand. Pre-incubation with the ligand protected mutant receptors F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60) from the inhibitory effect of MTSEA, with protection levels ranging of 74%, 46% and 72% respectively, but only provided 8 % protection for mutant L126C^(3.28) and no protection for mutant receptors F127C^(3.29) and I188C^(4.64) (Fig. 6). The likely basis for this discrepancy is discussed below.

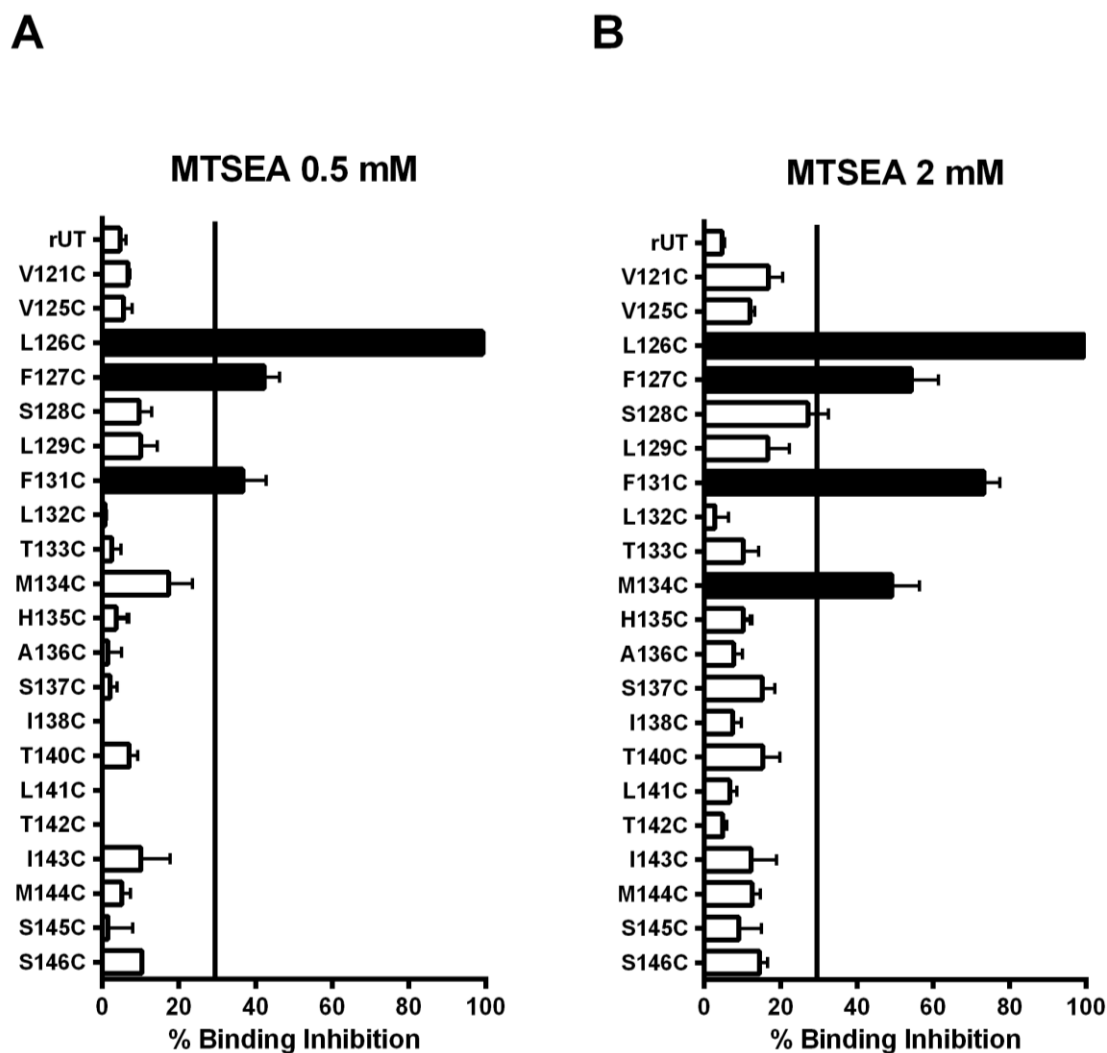


Fig. 3. Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM3. Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TM3 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.05 nM 125 I-Ull. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

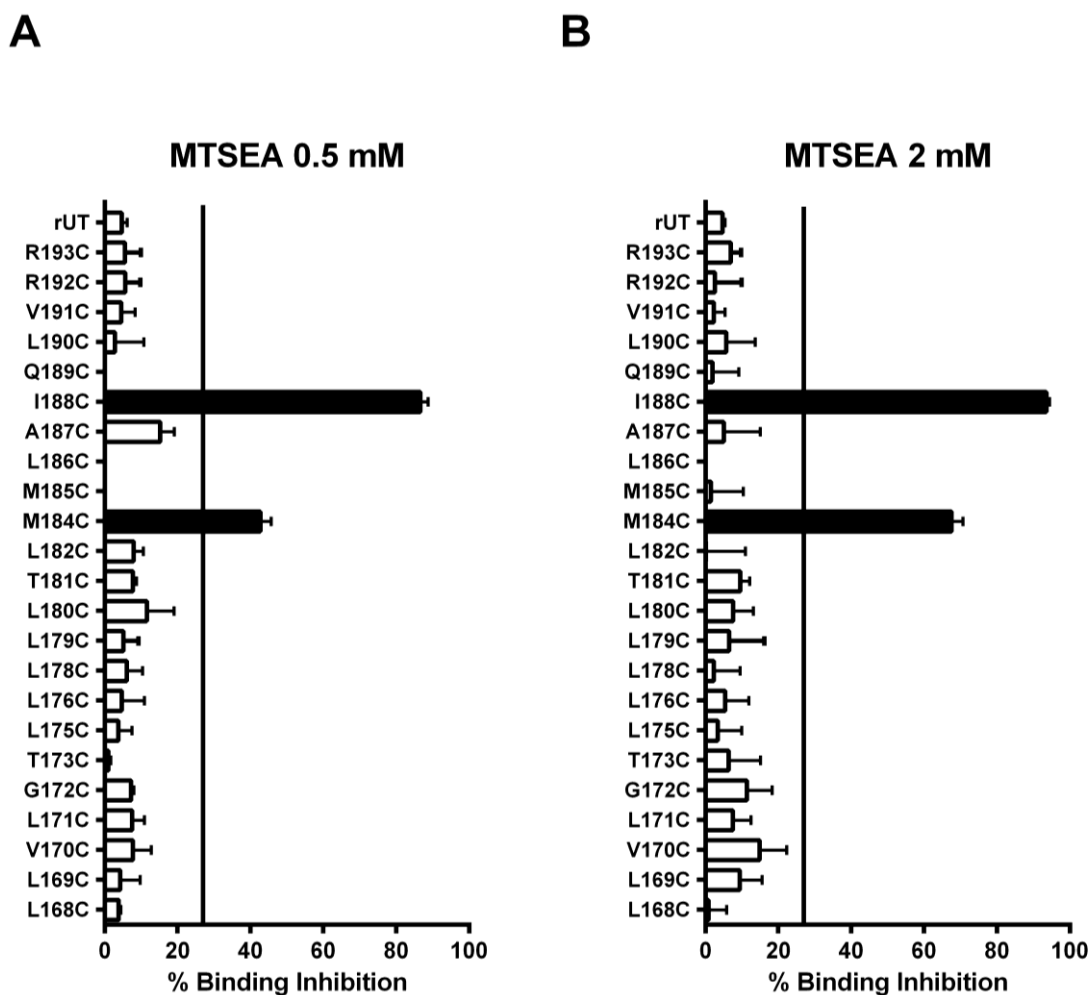


Fig. 4. Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM4. Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TM4 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.05 nM ^{125}I -UII. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants. It was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to that of the wild type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

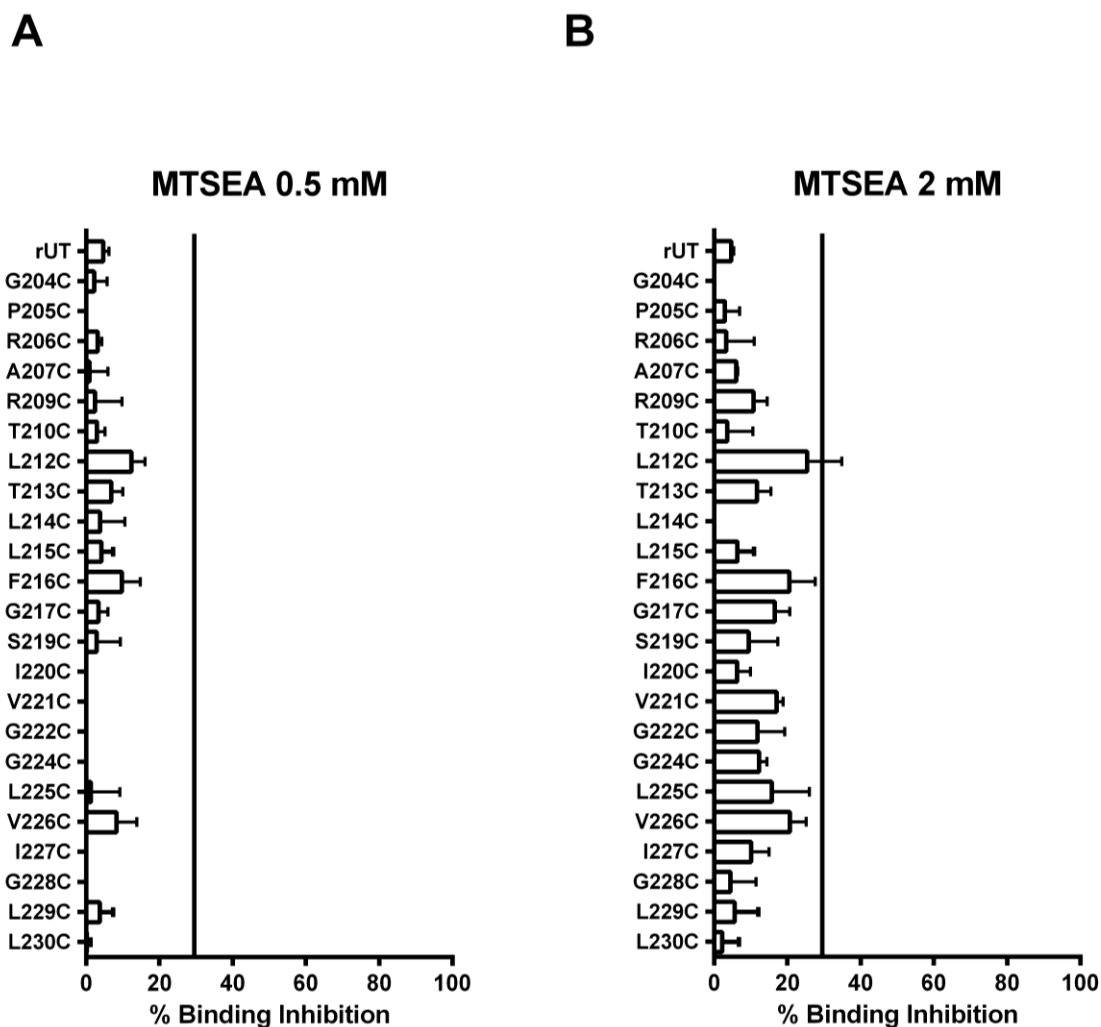


Fig. 5. Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM5. Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TM5 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.05 nM 125 I-UUI. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants. It was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to that of the wild type receptor after MTSEA treatment. Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

3.4 Functional property of SCAM-positive receptor mutants

In order to determine if cysteine mutations compromise (or not) the functional integrity of protected MTSEA-sensitive receptor mutants (F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60)), we evaluated their signaling capacities by measuring $G\alpha_q$ -dependent IP₁ production in transiently transfected COS-7 cells. Fig. 7 shows the relative amounts of myo-inositol-1-phosphates accumulated under stimulated conditions (with 1 μ M of UII) or basal conditions. Cells expressing cysteine mutant receptors F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60) displayed activity levels that were similar to that of the wild-type rUT receptor after stimulation with UII. These results show that introducing cysteine residues (F131C, M134C and M184C) into the wild-type rUT receptor did not compromise the $G\alpha_q$ -dependent activity of the receptor.

3.5 Modeling of the UII/rUT receptor complex

To assess the relative positions of the residues identified in the binding pocket of rUT, we modeled the UII/rUT receptor complex. We used I-TASSER to generate a homology model of the receptor and performed a short molecular dynamic (MD) simulation with distance restraints derived from photolabeling results, and previous docking efforts [37] to guide UII inside the binding pocket. An RMSD of 1.82 Å between the C α atoms of the rUT receptor structure before the simulation (after energy minimization) and after the simulation indicates that its shape changed slightly during the MD simulation. If we consider all carbon atoms of UII, the RMSD is of 2.85 Å, indicating that the sidechains of UII were reoriented during the MD simulation. The rUT receptor could not significantly change shape due to the positional restraints on the backbone atoms of the TMs (Fig. 8).

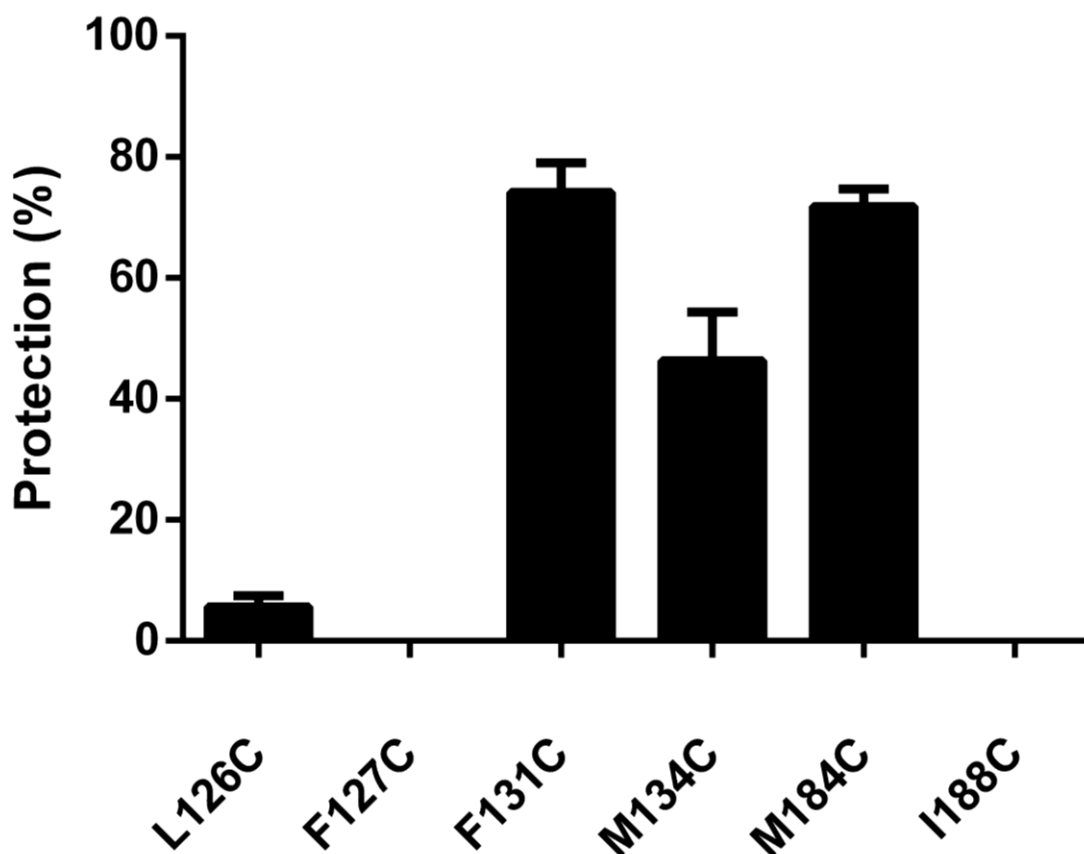


Fig. 6. UII protection of MTSEA-sensitive receptor mutants. Intact COS-7 cells transiently expressing the indicated MTSEA-sensitive rUT receptor mutants were pre-incubated for 1h at 16°C in the absence or presence of 100nM UII. The cells were then washed with PBS to remove excess ligand and treated with 2mM MTSEA to achieve maximal binding inhibition of each receptor. The cells were then washed with ice-cold PBS and incubated for 3h at 16°C with 0.05 nM 125 I-UII. The degree of protection was calculated as described in Materials and Methods. Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

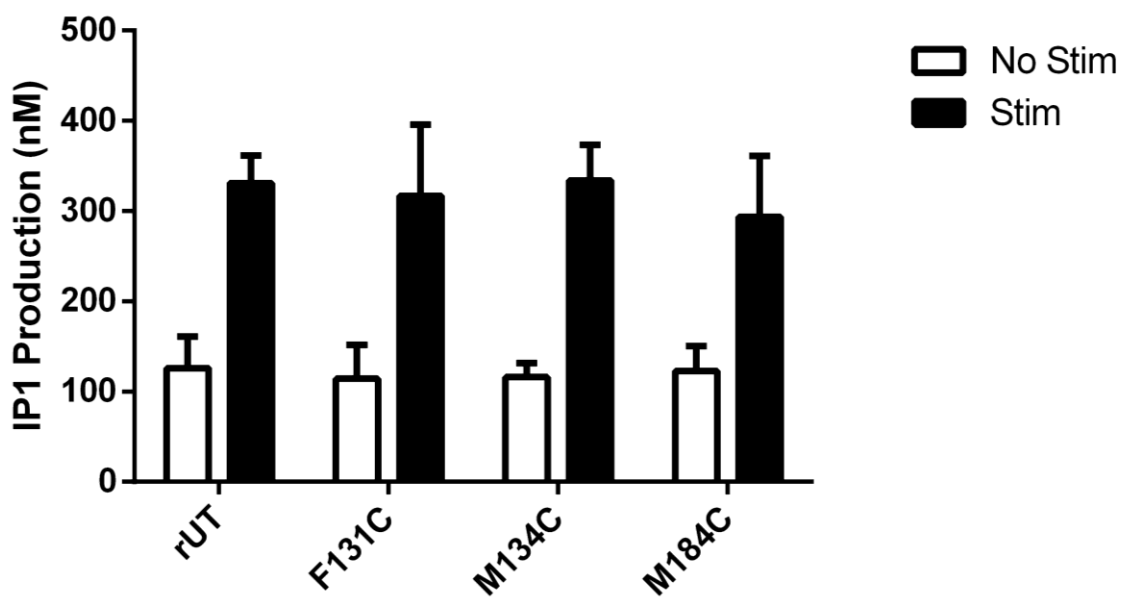


Fig. 7. Functional property of SCAM-positive receptor mutants. Intact COS-7 cells expressing the protected MTSEA-sensitive rUT receptor mutants were stimulated in the presence or absence of 1 μ M UII. IP₁ accumulation was assessed using the IP-One HTRF assay to measure G α_q -coupled receptor activation. Bars represent the mean \pm SD of results from at least three independent experiments.

DISCUSSION

The rationale of this study, which relied on SCAM analyses, was to gain an insight into the orientation of TM3, TM4 and TM5 residues within the binding pocket of the rUT receptor. Using this approach, we had previously identified residues in TM6 and TM7 that participated in the formation of the rUT receptor binding pocket [23]. SCAM is based on the reactivity of engineered cysteines to MTSEA, a reagent that reacts 10^9 times faster with ionized cysteines than with the un-ionized thiols [17] and thus will covalently alkylate any cysteine located in a hydrophilic environment. Indeed lipid-exposed, buried, or disulfide-bonded cysteines are unlikely to ionize to a significant extent and hence are assumed to be unaffected by such modification induced by MTSEA. The tracer peptide used in our study was the full-length agonist of the wild-type UT receptor since we felt that it would enable us to identify determinants that might otherwise be missed with smaller peptide or non-peptide UT ligands.

We initially determined the binding properties of each TM3, TM4 and TM5 cysteine mutants in a wild-type background. We demonstrated that a surprising number of these mutants (in TM3: F118C^(3.20), G119C^(3.21), D120C^(3.22), G122C^(3.24), R124C^(3.26), D130C^(3.32), F139C^(3.41); in TM4: W174C^(4.50), A177C^(4.53), P183C^(4.59), G194C^(4.70); in TM5: W203C^(5.30), H208C^(5.35), Y211C^(5.38), T218C^(5.45), P223C^(5.50)), did not show any detectable binding towards UII. Indeed, with the exception of D130C^(3.32), all of these mutants showed reduced cell surface expression that was most likely due to improper receptor maturation and/or folding (Fig. 2). In TM3, mutant D130C^(3.32) showed similar surface expression compared to the wild-type receptor, suggesting that replacing an aspartic acid with a cysteine alters the binding properties of UII. However, since position 3.32 is a key residue for ligand binding in many GPCRs of class A such as the A2A adenosine receptor and the dopamine D3 receptor [10,38], the loss of binding by the D130C^(3.32) mutant was not surprising. Accordingly, mutation of this aspartic acid has been shown to diminish the binding of various protonated amine ligands in other receptor systems [9,39,40]. Since positions

4.50 and 5.50 are the most conserved residues of TM4 and TM5, the loss of binding by the W174C^(4.50) and P223C^(5.50) mutant was not unexpected. In TM5, position 5.38 is a ligand contact point for several GPCRs such as the β 2-adrenergic receptor and the A2A adenosine receptor [40-42]. It has also been shown that position 5.30 is involved in ligand-binding interaction in the A2A adenosine receptor [10].

The rUT receptor has six endogenous cysteines, two of which are thought to be involved in the putative disulfide bridge linking ECL1 and ECL2. Of the four remaining endogenous cysteines, one is located in TM1 (C77^(1.58)), another one in TM6 (C271^(6.47)) and two are located in TM7 (C304^(7.40) and C311^(7.47)). The wild-type rUT receptor is insensitive to MTSEA at concentrations up to 6 mM [23]. This suggests that endogenous cysteines are not alkylated by MTSEA reagents or that alkylation does not affect UII binding. Our approach of adding the MTSEA reagent to whole adherent cells expressing the rUT receptor essentially exposed only the extracellular, ligand-accessible side of the receptor. Using SCAM, we identified six MTSEA-sensitive residues: four in TM3 (L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) and M134C^(3.36)) and two in TM4 (M184C^(4.60) and I188C^(4.64)). Conversely, we were unable to detect any MTSEA-sensitive residues in TM5. This suggests that these residues are part of the rUT receptor binding pocket and alkylation of these residues blocks the binding UII.

MTSEA treatment revealed that TM3 cysteine mutants L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) and M134C^(3.36) lost their ability to bind ¹²⁵I-UII. As discussed above, our model and data reveal that residues F131C^(3.33) and M134^(3.36) are well positioned towards the interior of the transmembrane bundle and are deeper inside the pocket relative to the other MTSEA-sensitive residues. This model is further corroborated by previous homology modeling of rUT receptor [43], which also suggested that L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) and M134^(3.36) are located in the binding pocket of rUT receptor. In the crystal structure of the β 2 adrenergic receptor, these analogous residues interact with the inverse agonist carazolol and the agonist BI-167107 [40,42]. Positions 3.28, 3.29 and 3.33 have also been shown to contact the

agonist (CXCL12) and antagonist (CVX15) in the chemokine CXCR4 receptor [11]. Furthermore, residues F106^(3.28), V111^(3.33) and C114^(3.36) of the dopamine D3 receptor also contact the small molecule D2R/D3R-specific antagonist eticlopride [38]. Moreover, a molecular docking study with the UT receptor superagonist P5U ([Pen⁵]hUII(4–11)) and the antagonist urantide ([Pen⁵,D-Trp⁷,Orn⁸]hUII(4–11)) revealed that the critical residue Trp7 of those ligands interacts directly with residues F131C^(3.33) and M134^(3.36) of TM3 whereas residue Tyr9 interacts with residue L126C^(3.28) and F127C^(3.29) [37], indicating that positions 3.28, 3.29, 3.33 and 3.36 may participate in the formation of the binding pocket and can contact both agonists and antagonists.

As for TM4 residues, our model shows that MTSEA-sensitive residues M184^(4.60) and I188^(4.64) face the binding pocket. Using photoactive ligands, we had previously identified M184/M185 residues as contact sites of the rUT receptor [29,35], suggesting that M184^(4.60) is a potential key residue in the ligand-binding cavity. This result thus reinforces our interpretation of the SCAM results and the validity of the rUT receptor model. Docking studies suggest a ligand interaction with the residue in position 4.60 in the human UT receptor binding pocket. Indeed, the analysis reveals that Phe6 of P5U and urantide interacts directly with residues M184^(4.60) and I188^(4.64) of TM4 [37] as suggested by our SCAM results. Interestingly, it should be noted that residue M184^(4.60) has a role in binding selectivity between human and rat UT receptors [43]. There is an interspecies variability in which palosuran, a nonpeptidic antagonist, is very selective for the human over the rat receptor. In the human UT receptor, position 4.60 is Val while it is Met in the rat receptor. Kim *et al.* found that the rUT receptor had reduced binding when M184^(4.60) was mutated to valine [43]. Binding at the human receptor favored a particular orientation of the quinoline ring of palosuran with favorable Van der Waals interaction with V184^(4.60), while binding at the rat receptor gave rise to another conformation [43]. Moreover, previous studies on the CXCR4 chemokine receptor have already shown that the residue in position 4.60 is implicated in the binding pocket of the CXCR4 receptor [11,24]. Taken together, all these data indicate that

residues M184^(4.60) and I188^(4.64) may participate and play an important role in the binding-site cavity of the rUT receptor.

It has been previously suggested that TM5 may participate in the activation of the UT receptor [29], as well as in other GPCR models like the AT₁ receptor [44], Histamine H1 receptor [45], A2A adenosine and β 2-adrenergic receptors [46]. Nevertheless, no loss of binding to UII was detected following treatment of MTSEA for all TM5 mutants tested. At first glance, this would suggest that TM5 does not participate in the formation of the rUT receptor binding pocket in the ground state, which is supported by our molecular model showing that TM5 is remote from the binding cavity (Fig. 8). However, according to our strategy, only residues that retained UII binding and MTSEA sensitivity are retained in order to assess their location in the binding cavity by protection assays with the natural ligand.

The protection of TM3 mutants F131C^(3.33) and M134C^(3.36) and TM4 mutant M184C^(4.60) from alkylation with UII (Fig. 6) supports the notion that those residues are located deeply the binding pocket (Fig. 8). Our results indicate that although the L126C^(3.28), F127C^(3.29) and I188C^(4.64) mutants are MTSEA sensitive, pre-incubating these mutants with UII prior to the MTSEA treatment did not have a protective effect. Our model suggests that M184C^(4.60) is closer to UII than the other MTSEA-sensitive residues which may be the reason for the protection of M184C^(4.60) by the peptide. The model also suggests that even though L126C^(3.28), F127C^(3.29) and I188C^(4.64) are found mostly in the extracellular portion of the receptor and face the exterior of the binding cavity, these residues are in close proximity to other MTSEA-sensitive residues such as F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60). To explain how mutants L126C^(3.28), F127C^(3.29) and I188C^(4.64) are sensitive to MTSEA-treatment but resistant to the protective effect of UII, we hypothesize that these residues may be involved in a network of interactions that are critical for receptor stability and ligand recognition. This network may involve other proximal MTSEA-sensitive residues such as F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60) and could be destabilized following MTSEA treatment of the L126C^(3.28), F127C^(3.29) and I188C^(4.64) mutants.

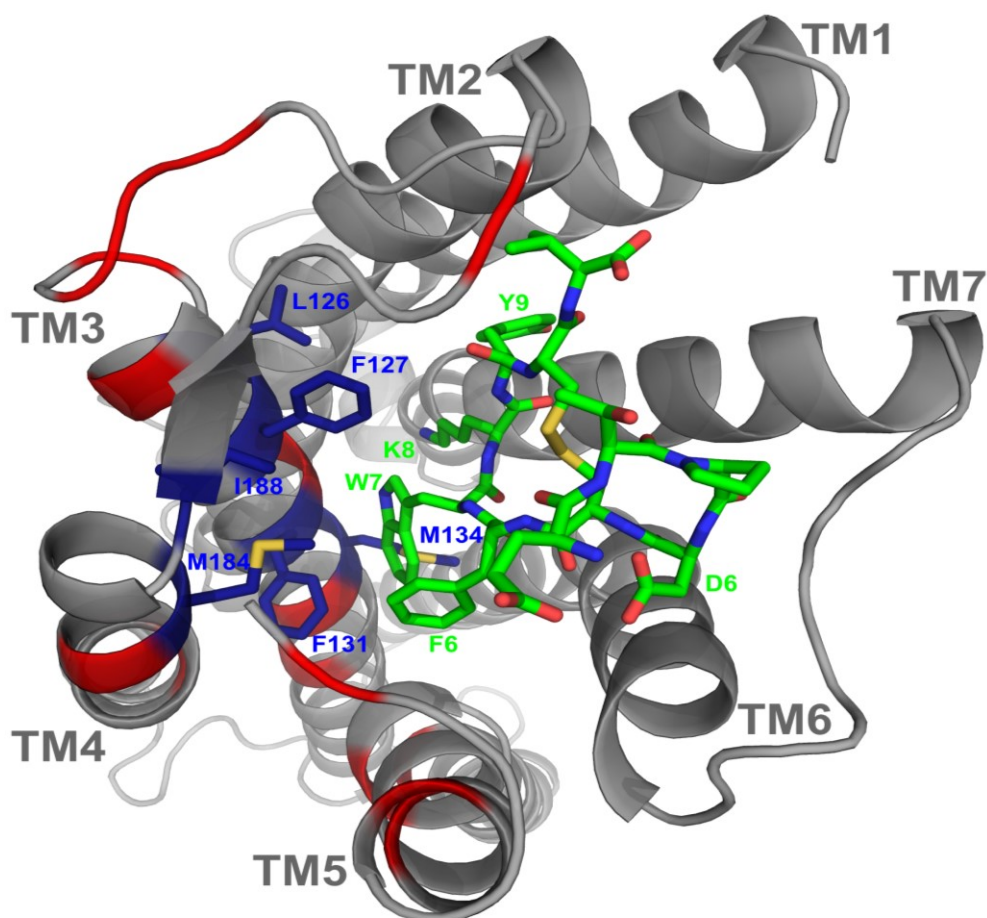


Fig. 8. Molecular model of rUT receptor. An extracellular view of the seven TMs of rUT receptor based on a multiple-template homology model. The water accessible crevice forming the binding pocket is suggested to be located between TMs 1,2,3,4,5,6 and 7. In the ground state, constraining intramolecular interactions help maintain the receptor in a basal state where functional coupling with the G-protein is kept to a minimum. The U11 ligand is shown in green. MTSEA positive residues L126^(3.28), F127^(3.29), F131^(3.33), M134^(3.36), M184^(4.60) and I188^(4.64) are indicated in blue. Residues F118^(3.20), G119^(3.21), D120^(3.22), G122^(3.24), R124^(3.26), D130^(3.32), F139^(3.41), W174^(4.50), A177^(4.53), P183^(4.59), G194^(4.70), W203^(5.30), H208^(5.35), Y211^(5.38), T218^(5.45) and P223^(5.50), where cysteine substitution caused loss of binding, are indicated in red.

It should be noted that protected MTSEA-sensitive residues F131C^(3.33), M134^(3.36) and M184^(4.60) show unchanged K_d values compared to the wild-type rUT receptor (Tables 1 and 2). Furthermore, F131C^(3.33), M134C^(3.36) and M184C^(4.60) mutants produced inositol phosphates at the same level as those of the wild-type rUT receptor after stimulation with UII (Fig. 7). This result suggests that introduction of cysteine residues at these positions does not perturb the structure and the functional activity of the receptor. Upon inspection of the molecular model, we note that the side-chains at these positions are within the binding site (Fig. 8). Hence these side-chains are fully accessible for alkylation, thereby affecting the binding of the ligand. Consequently, it is the alkylation with the MTSEA reagent and presence in the binding pocket, not the nature of the side chain, which leads to reduced binding.

In conclusion, we identify specific residues in TM3 and TM4 that participate in the formation of the binding pocket of the rUT receptor. Our results suggest that the UT binding pocket shares many similarities with those of previously described class A GPCRs. This study provides a significant advance in our goal to develop a valuable molecular model of the UT receptor and its ligand binding pocket. Indeed, these results and those previously obtained with TM6 and TM7 [23] have allowed us to develop an experimentally validated and highly relevant homology model for the rUT receptor. In absence of a crystal structure of UT, this model represents the best platform to understand the mechanism of ligand binding and the design of new ligands that could potentially be therapeutically useful.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR).

REFERENCES

- [1] Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, *et al.* Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980;77:5021-4.
- [2] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, *et al.* Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282-6.
- [3] Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr.Opin.Pharmacol.* 2003;3:159-67.
- [4] Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2005;19:65-75.
- [5] Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2006;46:481-519.
- [6] Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 2008;29:691-9.
- [7] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739-45.
- [8] 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.

- [9] Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2008;454:486-91.
- [10] Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 2008;322:1211-7.
- [11] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010;330:1066-71.
- [12] Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, *et al.* Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 2012;485:400-4.
- [13] Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, *et al.* Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 2012;485:327-32.
- [14] Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, *et al.* Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 2012;485:321-6.
- [15] Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 1992;258:307-10.
- [16] Javitch JA, Li X, Kaback J, Karlin A. A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:10355-9.

- [17] Javitch JA, Shi L, Liapakis G. Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* 2002;343:137-56.
- [18] Boucard AA, Roy M, Beaulieu ME, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, *et al.* Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J.Biol.Chem.* 2003;278:36628-36.
- [19] Fu D, Ballesteros JA, Weinstein H, Chen J, Javitch JA. Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 1996;35:11278-85.
- [20] Javitch JA, Ballesteros JA, Weinstein H, 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* 1998;37:998-1006.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Holleran BJ, Domazet I, Beaulieu ME, Yan LP, Guillemette G, Lavigne P, *et al.* Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem.Pharmacol.* 2009;77:1374-82.
- [24] Boulais PE, Escher E, Leduc R. Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state. *Biochem.Pharmacol.* 2013;85:541-50.

- [25] 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.
- [26] 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. *Receptor Molecular Biology* 1995;25.
- [27] Zhang Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins* 2007;69 Suppl 8:108-17.
- [28] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 2010;5:725-38.
- [29] Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E, Leduc R. Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem. J.* 2007;402:51-61.
- [30] Kutzner C, Czub J, Grubmuller H. Keep It Flexible: Driving Macromolecular Rotary Motions in Atomistic Simulations with GROMACS. *J. Chem. Theory Comput.* 2011;7:1381-93.
- [31] Jorgensen WL, Tirado-Rives J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* 1988;110 (6).
- [32] Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118 (45).

- [33] Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *The journal of physical chemistry. B* 2001;105 (28).
- [34] Tsui V, Case DA. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 2000;56:275-91.
- [35] Boucard AA, Sauve SS, Guillemette G, Escher E, Leduc R. Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem.J.* 2003;370:829-38.
- [36] Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J.Biomol.NMR* 1996;8:477-86.
- [37] Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Auriemma L, Sala M, *et al.* New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on P5U and urantide. *J.Med.Chem.* 2009;52:3927-40.
- [38] Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, *et al.* Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 2010;330:1091-5.
- [39] Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, *et al.* Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 2012;482:552-6.
- [40] Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 2007;318:1266-73.

- [41] Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG, *et al.* Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* 2011;332:322-7.
- [42] Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 2011;469:175-80.
- [43] Kim SK, Li Y, Park C, Abrol R, Goddard WA, 3rd. Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations. *ChemMedChem* 2010;5:1594-608.
- [44] 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.
- [45] Sansuk K, Deupi X, Torrecillas IR, Jongejan A, Nijmeijer S, Bakker RA, *et al.* A structural insight into the reorientation of transmembrane domains 3 and 5 during family A G protein-coupled receptor activation. *Mol.Pharmacol.* 2011;79:262-9.
- [46] Deupi X, Standfuss J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 2011;21:541-51.

ARTICLE 2

Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the Urotensin II receptor

Auteurs de l'article: Xavier Sainsily, Jérôme Cabana, Brian J. Holleran, Pierre Lavigne, Emanuel Escher, and Richard Leduc

Statut de l'article: Publié dans *Biochem. Pharmacol.* (2014); 92(2), 280-288.

Avant-propos: J'ai contribué à cet article en effectuant toutes les manipulations expérimentales à l'exception de la modélisation moléculaire. J'ai contribué à la conception du projet et à l'écriture du manuscrit.

Résumé : Chez l'homme, l'urotensine II (UII) est un peptide cyclique de 11 acides aminés, largement distribué dans les systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrinien, où il se lie à un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) connu sous le nom d'UT. L'implication de ce récepteur dans différentes conditions pathophysiologiques comme l'athérosclérose, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque et le diabète en fait une cible thérapeutique potentielle très intéressante. Pour évaluer comment l'UII se fixe sur le récepteur UT, via l'identification des résidus spécifiques des domaines transmembranaires (TM) un (TM1) et deux (TM2) qui sont impliqués dans la formation de la pochette de liaison de ce récepteur, nous avons utilisé la technique de SCAM (*Substituted-cysteine accessibility method*). Chaque résidu des TM1 (V49^(1.30) à M76^(1.57)) et du TM2 (V88^(2.41) à H117^(2.70)) ont été mutés, un à un, en cystéine. Les mutants ainsi obtenus ont été ensuite exprimés dans des cellules COS-7 et traités avec l'agent alkylant spécifique des sulfhydryles, le MTSEA. Les résultats des traitements au MTSEA montrent une inhibition de liaison avec le ligand radiomarqué [¹²⁵I]UII pour le mutant I54C^(1.35) dans le TM1 et des mutants Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) et Y111C^(2.64) dans le TM2. Ces résultats permettent d'identifier les résidus clés structuraux dans les TM1 et TM2 qui participent à la formation de la pochette de liaison du récepteur UT. En associant ces résultats avec nos précédentes analyses de SCAM sur les TM3, TM4, TM5, TM6 et TM7 nous pouvons présenter l'ensemble des résidus des 7 TM susceptibles de participer à la pochette de liaison du récepteur UT, nous permettant ainsi de proposer un modèle du site de liaison orthostérique de ce récepteur.

Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor

Xavier Sainsily, Jérôme Cabana, Brian J. Holleran, Emanuel Escher, Pierre Lavigne and Richard Leduc[#]

Department of Pharmacology, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H5N4

Running title: Identification of TM1 and TM2 residues of the UT receptor binding pocket

[#]Corresponding author

Richard Leduc, Ph.D.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine and Health Sciences

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec

Canada J1H 5N4

Tel.: ;

Fax: ;

E-mail:

ABSTRACT

The vasoactive urotensin-II (UII), a cyclic undecapeptide widely distributed in cardiovascular, renal and endocrine systems, specifically binds the UII receptor (UT receptor), a G protein-coupled receptor (GPCR). The involvement of this receptor in numerous pathophysiological conditions including atherosclerosis, heart failure, hypertension, renal impairment and diabetes potentially makes it an interesting therapeutic target. To elucidate how UII binds the UT receptor through the identification of specific residues in transmembrane domains (TM) one (TM1) and two (TM2) that are involved in the formation of the receptor's binding pocket, we used the substituted-cysteine accessibility method (SCAM). Each residue of TM1 (V49^(1.30) to M76^(1.57)) and TM2 (V88^(2.41) to H117^(2.70)) was mutated, one by one, to a cysteine. The resulting mutants were then expressed in COS-7 cells and subsequently treated with the sulfhydryl-specific alkylating agent methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA). MTSEA treatment resulted in a significant binding inhibition of ¹²⁵I-UII to mutant I54C^(1.35) in TM1 and mutants Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64) in TM2. These results identify key structural residues in TM1 and TM2 that participate in the formation of the UT receptor binding pocket. Together with previous SCAM analysis of TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7, these results have led us to identify residues within all 7 TMs that participate in UT's binding pocket and have enabled us to propose a model of this receptor's orthosteric binding site.

Keywords: Urotensin-II, G protein-coupled receptor, UT receptor, Substituted-cysteine accessibility method, molecular model.

1. INTRODUCTION

The cyclic undecapeptide urotensin-II (UII), initially isolated from the caudal neurosecretory cells of the Teleost goby fish [1], is described as the most potent vasoactive peptide in mammals [2]. UII binds the urotensin-II receptor (UT receptor), a member of family “A” of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily [2]. Many structural features are associated with this family such as a short N-terminus, a highly conserved residue in each transmembrane domain (TM), a (D/E)R^(3.50)Y “Ionic lock” motif [3] at the interface between the TM3 and the second intracellular loop (ICL), a C(W/F)XP^(6.50) “rotamer toggle switch” motif [4] in TM6, a NP^(7.50)XXY “tyrosine toggle switch” motif in TM7, and potential serine/threonine phosphorylation sites in the cytoplasmic tail [5,6]. The UT receptor also has two cysteine residues which participate in disulfide bonding between the first and second extracellular loops (ECL) (Fig.1). The UII/UT receptor system has been detected in the central nervous system, and is widely expressed in human tissues, including heart, liver, kidney and pancreas. This system is considered as a pharmacological target in the pathophysiology of hypertension, atherosclerosis, diabetes, heart failure and renal diseases [7-9].

The molecular mechanisms by which agonists bind to and activate GPCRs through conformational changes are not completely understood. Although for many years the only available structural model of a GPCR was rhodopsin [10], recently the three-dimensional crystal structures of other GPCRs such as the β -adrenergic receptors [11,12], adenosine A2A receptor [13], chemokine receptors [14,15], serotonin receptors [16,17] and opioid receptors [18-22] have been determined. More recently, NMR spectroscopy was used on several GPCRs such as the substance-P receptor [23], the chemokine CXCR1 receptor [24] and the β_2 -adrenergic receptor [25] to characterise the conformational dynamics of the transmembrane core of GPCRs. These studies have enabled a better understanding of how diffusible ligands can recognize and interact with residues of the binding pocket of GPCRs.

Despite these major advances, many questions remain regarding the subtle variations found in different GPCR binding pockets. Hence, a variety of biophysical and biochemical approaches are needed to identify those key determinants that make up the binding cavity. The substituted-cysteine accessibility method (SCAM) [26-28] has proven to be useful for systematically identifying TM residues that contribute to the binding-site pocket of GPCRs. Consecutive residues within TMs are individually mutated to cysteine, and the mutant receptors are expressed in heterologous cells. If ligand binding to a cysteine-substituted mutant is unchanged compared to wild-type receptor, it is assumed that the structure of the mutant receptor, especially around the binding site, is similar to that of the wild-type receptor and that the substituted cysteine lies in an orientation similar to that of the residue of the wild-type receptor. In TMs, the sulfhydryls of cysteines oriented toward the aqueous binding-site pocket react more quickly with charged sulfhydryl reagents such as methanethiosulfonate-ethylammonium (MTSEA) than the sulfhydryls of cysteines that face the interior of the protein or the lipid bilayer. Two criteria are used to determine whether engineered cysteines are positioned at the surface of the binding-site pocket: (i) the reaction with the MTSEA reagent alters binding irreversibly and (ii) the reaction is retarded by the presence of the ligand. This approach has been used by us and others to identify residues that line the surface of GPCR binding-site pockets [29-37]. Indeed, using SCAM analysis, we have previously identified eleven MTSEA-sensitive residues in TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7 of the rat UT receptor (rUT receptor) [34,36] that make up that receptor's binding pocket. In this study, we report the identification of residues within TM1 and TM2 that forms the UT binding pocket and we propose a complete molecular model of the ligand-binding cavity of the rUT receptor.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The sulfhydryl-specific alkylating reagent MTSEA ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{-SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) was from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). X-tremeGENE HP transfection reagent was from Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), and penicillin/streptomycin were from Wisent Bioproduct (St-Bruno, QC, Canada). Bovine serum albumin (BSA) and bacitracin were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Oligonucleotide primers were from IDT (Coralville, IA, USA). Human UII was from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). ^{125}I -UII (specific activity 1000 Ci/mmol) was prepared using IODO-GEN (1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphenyl-glycoluril; Thermo Scientific Pierce, Nepean, ON, Canada) as described by Fraker and Speck [38]. Briefly, 10 μl of a 1 mM peptide solution was incubated with 20 μg of IODO-GEN, 80 μl of 100 mM borate buffer (pH 8.5), and 1mCi of $\text{Na-}^{125}\text{I}$ for 30 min at room temperature, and was then purified by reversed-phase HPLC on a C-18 column. The specific radioactivity of the labelled peptide was determined by self-displacement and saturation-binding analysis.

2.2 Numbering of Residues

Residues in TM1 and TM2 of the rat UT receptor were given two numbering schemes. First, residues were numbered according to their positions within the rUT receptor sequence. Second, residues were also indexed according to their position relative to the most conserved residue in each TM in which they are located [39]. By definition, the most conserved residue was assigned the position index "50" e.g. in TM1, N69 is the most conserved residue and was designated $\text{N69}^{(1.50)}$, whereas the upstream residue was designated $\text{G68}^{(1.49)}$ and the downstream residue $\text{V70}^{(1.51)}$.

2.3 Site-directed mutagenesis

Mutant receptor cDNAs were constructed by oligonucleotide-directed PCR-based mutagenesis (QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, CA, USA) using rUT receptor cDNA subcloned in the mammalian expression vector pcDNA3.1. A set of forward and reverse oligonucleotides were synthesized to introduce cysteine mutations between V49^(1.30) and M76^(1.57) for TM1 and between V88^(2.41) and H117^(2.70) for TM2, and the mutations were confirmed by nucleotide sequencing.

2.4 Cell culture

COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% (vol/vol) FBS, 100 IU/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin at 37°C. Semi-confluent cells (70%) in 100-mm-diameter Petri dishes were transfected using X-tremeGENE HP as described by the manufacturer. Transfected cells were used 24h post-transfection for binding and 48h post-transfection for SCAM assays.

2.5 Binding experiments

COS-7 cells were washed once with PBS and subjected to one freeze-thaw cycle. Broken cells were gently scraped into washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂), centrifuged at 2500g for 15 min at 4°C, and resuspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 0.01% bacitracin). Saturation binding experiments were performed by incubating broken cells (4-10 µg of protein) for 1h at room temperature with increasing concentrations of ¹²⁵I-UII (0.15-20 nM) in a final volume of 200 µl. Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM unlabeled UII. Bound radioactivity separated from free ligand by filtration through glass fiber filter plates (Millipore, MA, Billerica,) and washed 3 times with 200 µL of ice-cold washing buffer. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ-radiation counting. Results are presented as means ± SEM. Binding data (B_{max} and K_d) were analyzed with GraphPad Prism version 6.04 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using a one-site binding hyperbola nonlinear regression analysis.

2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

COS-7 cells were seeded in 24-well plates at 30 000 cells/well. 48h post-transfection, cells were fixed in 3.7% (v/v) formaldehyde/Tris-buffered saline (TBS) (20mM Tris-HCl pH 7.5 and 150mM NaCl) for 5 minutes at room temperature. Cells were then washed twice with TBS and incubated 30 min with TBS containing 1% BSA at room temperature to block non-specific binding. A mouse monoclonal anti-cMyc (clone 9E10, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) was added at a dilution of 1:5000 in TBS-BSA 1% for 60 min. Following incubation with the primary antibody, cells were washed twice with TBS and anti-mouse IgG-peroxydase antibody (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was then added at a dilution of 1:10000 in TBS-BSA 1% for 60 min. Following the incubation with the secondary antibody, cells were washed twice with TBS and 250 μ L of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (T0440, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was added. The plates were incubated at room temperature and the reaction was stopped using 250 μ L of HCl 2N. 200 μ L of the colorimetric reaction was transferred to a 96-well plate and the absorbance was measured at 450 nm. Cells transfected with empty vector (pcDNA3.1) were used to determine background.

2.7 Treatment with MTSEA reagent

MTSEA treatment was performed according to the procedure of Javitch *et al.* [27], with minor modifications. Two days after transfection, cells, which were grown in 12-well plates, were washed with PBS and incubated for 3 min at room temperature with freshly prepared MTSEA at the desired concentrations (0.5 mM to 2 mM) in a final volume of 200 μ l. The reaction was stopped by washing the cells with ice-cold PBS. Intact cells were then incubated in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM 125 I-UII for 90 min at room temperature. After washing with ice-cold PBS, cells were lysed with 0.1N NaOH and the radioactivity was evaluated by γ -radiation counting. The percentage of fractional binding inhibition was calculated as $[1 - (\text{specific binding after MTSEA treatment} / \text{specific binding without treatment})] \times 100$.

2.8 Protection against MTSEA by UII

Transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and incubated in the presence or absence of 100 nM UII for 1h at 16°C (to avoid internalization of receptors). Cells were washed to remove excess ligand and were treated with the MTSEA reagent. Cells were washed three times with ice-cold PBS and once with an acidic buffer (150 mM NaCl, 50 mM acetic acid, pH 3.0) to dissociate bound ligand. They were then incubated for 3h at 16°C in binding medium (DMEM, 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA) containing 0.05 nM ¹²⁵I-UII. The percentage of protection was calculated as [(inhibition in the absence of UII) – (inhibition in the presence of UII)]/(inhibition in the absence of UII) x 100.

2.9 Homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) assay to measure inositol-phosphates

Measurement of myo-inositol-1-phosphate (IP₁) accumulation in COS-7 cells was performed using the IP-One HTRF assay (Terbium) kit as described by Cisbio (Bedford, MA, USA). Briefly, transfected cells grown in 12-well plates were washed once with PBS and transferred into 384-well cell plates (Perkin Elmer; Waltham, MA, USA; 12500 cells/well). Basal (vehicle) and stimulated (1μM UII) IP₁ production assay was performed using IP-One HTRF assay following manufacturer's instructions. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) readouts were performed with a Tecan Infinite M1000 premium Quad4 Monochromator.

2.10 Molecular modeling

The I-TASSER server [40,41] was used to generate a multiple-template homology model of rUT receptor from its primary structure (UT2R GenBank™ accession no. P49684). The top templates used by I-TASSER were the human delta-opioid receptor (PDB: 4N6H) [22] and the substance-P receptor (PDB: 2KS9) [23]. Out of the top five models predicted by I-TASSER, we selected the model that was the most appropriate to allow the insertion of UII in the rUT receptor binding pocket (model 1, C-score = 0.24). Previous modeling done by us was used as the basis for the initial UII peptide orientation within the binding pocket [42,34]. The GROMACS

software suite [43] was used with the OPLS/AA forcefield [44-46] and GBSA implicit solvent model [47] to perform potential energy minimization and a molecular dynamic simulation of the UII/rUT receptor complex. Distance restraints based on previous photolabeling results [42, 48] and docking experiments [49] were used to guide and orient UII docking inside the binding pocket. The distance restraints were implemented in the topology file using $r_0 = 0\text{\AA}$, $r_1 = 7\text{\AA}$ and $r_2 = 12\text{\AA}$ between the C β atoms of the corresponding residues, with a force constant of 3000 kJ/mol/nm^2 . More specifically, restraints between residue E1 (UII) and M288 (rUT receptor), residue F6 (UII) and M184 and M185 (rUT receptor), residue W7 (UII) and F131, F275 and W276 (rUT receptor), residue K8 (UII) and D130 (rUT receptor), residue Y9 (UII) and W116, L126 and F127 were used. The backbone heavy atoms of the rUT receptor TMs were restrained with a force constant of 1000 kJ/mol/nm^2 . The UII peptide, the intra and extra-cellular loops, the N- and C-terminal regions and the side chains of rUT receptor were unrestrained and free to move. Energy minimization was performed using one step of steepest descent algorithm every 100 steps of conjugate gradient algorithm, until the derivative reached machine precision ($E_{\text{pot}} = -6.01\text{e}+04\text{ kJ/mol}$ and $F_{\text{max}} = 1.38\text{e}+02\text{ kJ/mol/nm}$). This was followed by a short 1 nanosecond molecular dynamics simulation during which the system is gradually heated to 310 K over the first 100 picosecond of the simulation. The final frame of the MD trajectory was analyzed using ProCheck [50]. The results indicated that 98.1% of the residues of rUT receptor were in the “most favoured” and “additional allowed” regions. Images were produced with PyMOL. RMSD calculations were performed with the “g_rms” tool in GROMACS. The N- and C-terminal parts of the rUT receptor (before TM1 and after TM7) were not considered in RMSD calculations because of their highly unstructured nature in the rUT receptor homology model.

2.11 Statistical analysis

Calculations and statistics were performed using GraphPad Prism version 6.04 for Windows. All data are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) and statistical significance was tested using an unpaired Student's t-test. P values < 0.05 were considered statistically significant.

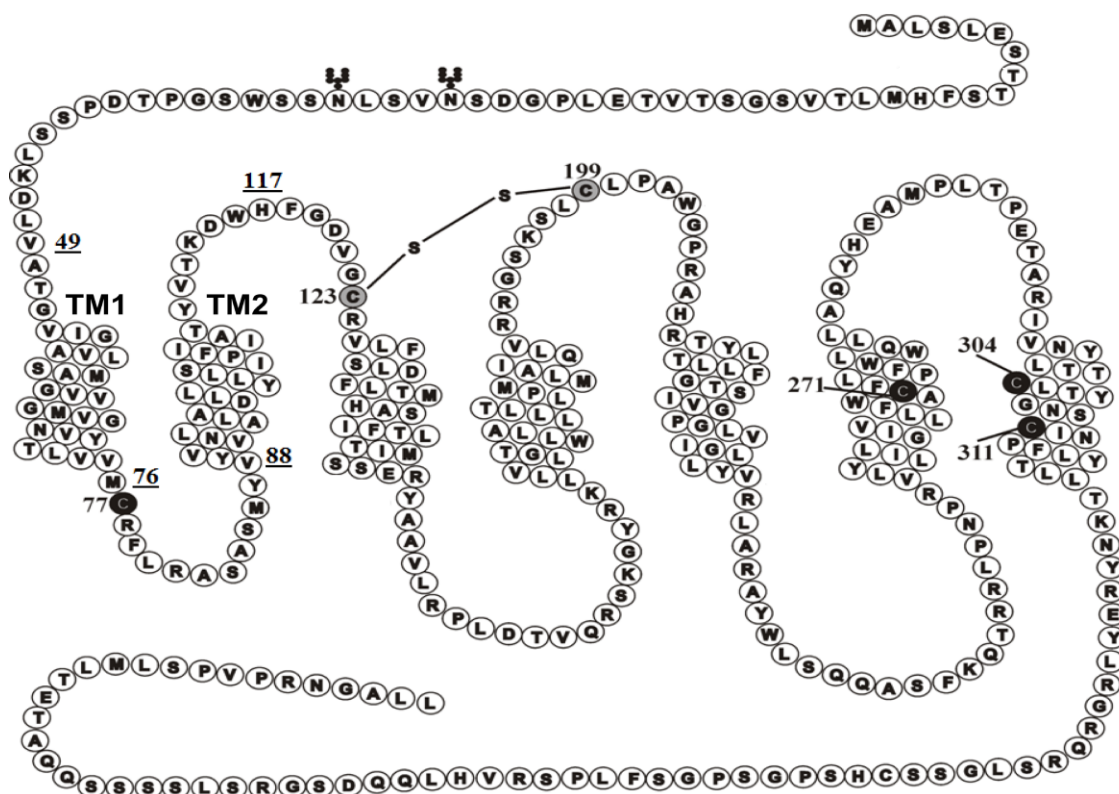


Fig. 1. Schematic representation of the rat UT receptor (rUT). The numbers indicate the position of cysteines and other residues in the receptor. The grey closed circles represent cysteines that are thought to be linked via disulfide bridges, and the black closed circles represent cysteines whose side chains do not form a disulfide bridge. Mutated TM1 residues are located between residues V49^(1.30) and M76^(1.57) inclusively. Mutated TM2 residues are located between residues V88^(2.41) and H117^(2.70) inclusively. Putative N-glycosylation sites (N29, N33) are indicated.

3. RESULTS

3.1 Binding properties of cysteine mutant receptors in TM1 and TM2

To identify residues in TM1 and TM2 that face the binding-site pocket of the rUT receptor, we mutated individually 28 consecutive residues between V49^(1.30) and M76^(1.57) of TM1 and 30 consecutive residues between V88^(2.41) and H117^(2.70) of TM2 to cysteine (Fig.1). Each mutant receptor was transiently expressed in COS-7 cells. To assess the conservation of the binding properties of the receptors after the substitutions, the pharmacological parameters of the equilibrium binding of the radiolabeled ligand ¹²⁵I-UII (K_d and B_{max}) were determined (Tables 1 and 2). Most mutant receptors exhibited binding affinities for ¹²⁵I-UII, similar to that of the wild-type rUT receptor. TM1 mutant G65C^(1.46) and TM2 mutants P105C^(2.58) and W116C^(2.69) did not demonstrate any detectable binding activity and were not used for the SCAM analyses. ELISA showed reduced cell surface expression of respectively 92%, 91% and 85% for these three receptor mutants G65C, P105C and W116C compared to the wild type receptor (Fig.2).

3.2 Effect of MTSEA treatment on the binding properties of TM1 and TM2 mutant receptors

To verify whether the reporter cysteines introduced into either TM1 or TM2 were oriented toward the rUT receptor binding pocket, cells expressing rUT mutant receptors were treated with 0.5 mM to 2 mM MTSEA for 3 min. It had been already demonstrated that the six endogenous cysteine residues of rUT receptor (Fig.1) were not involved in making rUT receptor sensitive to MTSEA treatment when binding of UII was used to evaluate a potential effect [34]. For TM1 mutants, treatment with 2 mM MTSEA revealed that mutant I54C^(1.35) showed binding inhibition of 47% (Fig.3). For TM2 mutants, treatment with 0.5 mM MTSEA revealed that mutants Y100C^(2.53), S103C^(2.56), I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64) showed binding inhibition of 38%, 46%, 98%, 86% and 54% respectively (Fig.3). At 2 mM MTSEA, the binding property of an additional mutant, F106C^(2.59), was significantly inhibited by 52% (Fig.4). Following MTSEA treatment, the binding properties of all other TM1 and TM2 mutant receptors were not significantly affected.

Table 1. Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM1 mutant receptors

Mutants	Kd (nM)	Bmax (pmol / mg protein)	n
rUT (WT)	1,9 ± 0,3	11,2 ± 1,5	6
V49C	3,9 ± 0,8*	11,1 ± 0,2	3
A50C	2,7 ± 0,3	9,3 ± 0,4	3
T51C	2,1 ± 0,1	12,1 ± 1,1	3
G52C	3,1 ± 0,02	14,5 ± 1,4	3
V53C	2,4 ± 0,1	11,5 ± 0,9	3
I54C	3,4 ± 0,07*	10,4 ± 1,1	3
G55C	5,9 ± 0,4**	19,4 ± 0,3*	3
A56C	3,3 ± 0,1	18,5 ± 2,6	3
V57C	2,1 ± 0,5	7,2 ± 2,1	3
L58C	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,5*	3
S59C	2,4 ± 0,08	16,2 ± 0,7	3
A60C	2,4 ± 0,2	13,8 ± 1,8	3
M61C	2,5 ± 0,4	8,7 ± 0,2	3
G62C	3,1 ± 0,7	19,1 ± 0,5*	3
V63C	1,8 ± 0,4	8,4 ± 1	3
V64C	2,2 ± 0,2	10,1 ± 2,4	3
G65C	NDB	NDB	3
M66C	2,4 ± 0,2	11,2 ± 2	3
V67C	2,7 ± 0,3	12,7 ± 1,3	3
G68C	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,3*	3
N69C	4,9 ± 0,1*	13,1 ± 2,1	3
V70C	1,9 ± 0,1	15,1 ± 1,6	3
Y71C	1,6 ± 0,07	7,2 ± 1,1	3
T72C	3,4 ± 0,04*	14,8 ± 1,4	3
L73C	2,5 ± 0,2	8,9 ± 0,1	3
V74C	2,6 ± 0,3	20,2 ± 1,6*	3
V75C	4,7 ± 0,4*	20,8 ± 2,1*	3
M76C	4,6 ± 0,6*	25,8 ± 1,7**	3

Cell transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Materials and Methods. Binding affinities (Kd) and maximal binding capacities (Bmax) are expressed as the means ± SEM of values obtained from at least three independent experiments performed in duplicate. Mutant G65C did not exhibit any detectable binding (NDB = No Detectable Binding). Residue in bold indicate mutant receptor for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; unpaired Student's t-test.

Table 2. Binding properties of UII to cysteine-substituted rUT TM2 mutant receptors

Mutants	Kd (nM)	Bmax (pmol / mg protein)	n
rUT (WT)	1,9 ± 0,3	11,2 ± 1,5	6
H117C	3,1 ± 0,4	8,1 ± 1,1	3
W116C	NDB	NDB	3
D115C	1,1 ± 0,07	2,6 ± 0,5**	3
K114C	3,7 ± 0,3*	6,9 ± 0,4	3
T113C	3,1 ± 0,2	9,5 ± 0,4	3
V112C	2,1 ± 0,3	8,1 ± 0,2	3
Y111C	5,8 ± 0,5**	2,9 ± 1,3*	3
T110C	2,7 ± 0,2	3,8 ± 0,4*	3
A109C	2,6 ± 0,2	6,6 ± 1,5	3
I108C	2,1 ± 0,4	2,6 ± 0,1**	3
I107C	7,1 ± 0,4***	5,4 ± 2	3
F106C	1,9 ± 0,2	3,4 ± 1,1*	3
P105C	NDB	NDB	3
I104C	6,4 ± 0,3***	5,2 ± 0,7*	3
S103C	1,1 ± 0,1	2,8 ± 0,8**	3
L102C	3,1 ± 0,3	14,5 ± 1,7	3
L101C	2,1 ± 0,3	8,3 ± 2,8	3
Y100C	3,2 ± 0,2*	4,6 ± 1,5	3
L99C	1,9 ± 0,3	3,3 ± 0,5*	3
L98C	2,5 ± 0,4	8,1 ± 0,3	3
D97C	6,8 ± 0,01***	3,9 ± 0,7*	3
A96C	4,5 ± 0,5**	12,1 ± 4,2	3
L95C	2,8 ± 0,5	14,1 ± 0,4	3
A94C	3,9 ± 0,5*	16,9 ± 0,6	3
L93C	4,9 ± 0,6**	4,1 ± 0,5	3
N92C	1,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1**	3
V91C	2,4 ± 0,1	15,8 ± 5,7	3
V90C	3,4 ± 0,4*	15,1 ± 0,1	3
Y89C	2,2 ± 0,2	7,8 ± 2	3
V88C	2,1 ± 0,05	17,3 ± 5,8	3

Cell transfected with the appropriate receptor were assayed as described in Materials and Methods. Binding affinities (Kd) and maximal binding capacities (Bmax) are expressed as the means ± SEM of values obtained in n from at least three independent experiments performed in duplicate. Mutants P105C and W116C did not exhibit any detectable binding (NDB = No Detectable Binding). Residues in bold indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; unpaired Student's t-test.

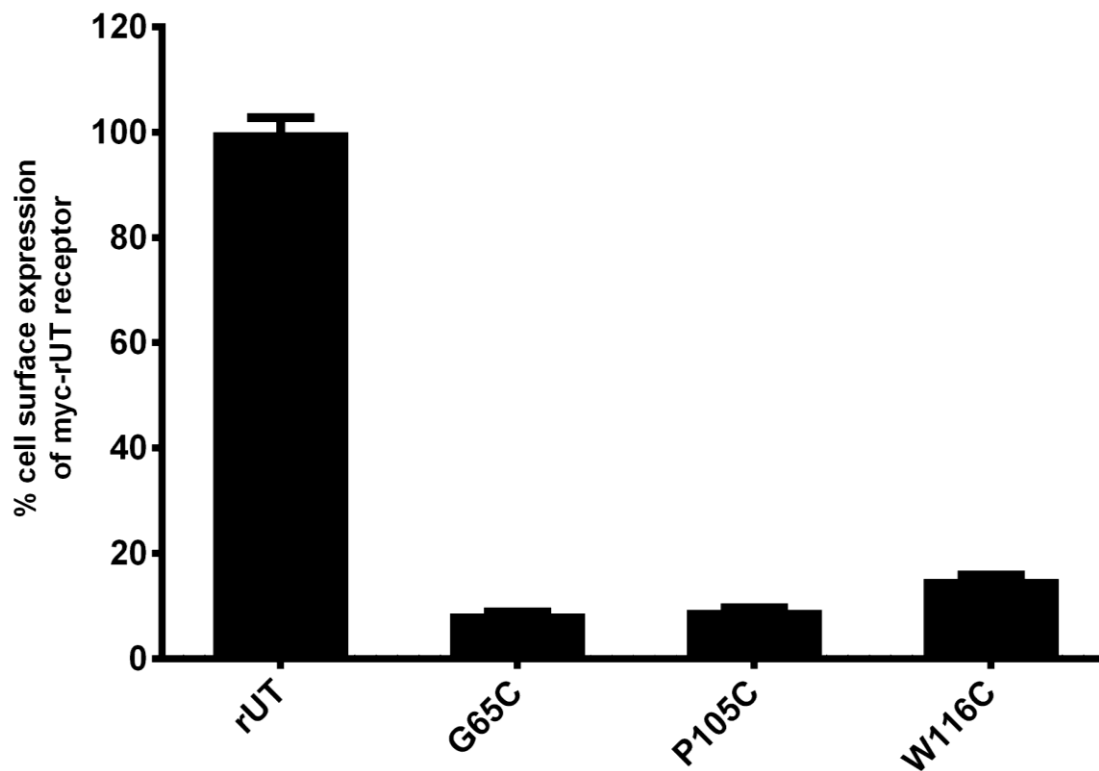


Fig. 2. Cell surface expression of rUT receptor mutants. Cell surface expression was measured by ELISA (as described under Materials and Methods) in COS-7 cells transiently expressing myc-rUT receptor mutants that were not detected in binding experiments. The results are shown as the percentage of cell surface receptor expression of the wild-type cMyc-rUT receptor (100%). Bars represent the mean \pm SEM of results from at least three independent experiments.

3.3 Protection against MTSEA reagent by a pre-treatment with UII

To confirm that reporter cysteines accessible to MTSEA were indeed located within the binding pocket of the rUT receptor, mutants were incubated with the competitive ligand, UII, prior to MTSEA treatment. Cells were then washed with an acid buffer to dissociate the bound ligand, and the receptors were assayed for binding with the radiolabeled competitive ligand. Pre-incubation with the ligand protected mutant receptors I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56) and F106C^(2.59) from the inhibitory effect of MTSEA, with protection levels of 25%, 34% 77% and 34% respectively, and no protection for mutant receptors I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64) (Fig.5). The likely basis for this discrepancy is discussed below.

3.4 Functional property of SCAM-positive receptor mutants

In order to determine if cysteine mutations compromised the functional integrity of protected MTSEA-sensitive receptor mutants (I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56) and F106C^(2.59)), we evaluated their signaling capacities by measuring $G\alpha_q$ -dependent IP₁ production in transiently transfected COS-7 cells. Figure 6 shows the relative amounts of myo-inositol-1-phosphates accumulated under stimulated conditions (with 1 μ M of UII) or basal conditions. Cells expressing cysteine mutant receptors I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56) and F106C^(2.59) displayed activity levels that were similar to that of the wild-type rUT receptor after stimulation with UII. These results show that introducing cysteine residues (I54C, Y100C, S103C and F106C) into the wild-type rUT receptor did not compromise the $G\alpha_q$ -dependent activity of the receptor.

3.5 Modeling of the UII/rUT receptor complex

To assess the relative positions of the MTSEA sensitive residues and validate their contribution to the binding pocket of rUT receptor, we have mapped their position on a homology structure of the UII/rUT receptor complex. We used I-TASSER to generate the homology model of the UT receptor. UII was positioned in the binding cavity based on previously identified contact points from photolabeling [42, 48] and previous docking efforts [49]. We next performed a short restrained

molecular dynamic (MD) simulation to refine the complex (Fig.7). Our interpretation of the model, which illustrates the contribution of residues within TM1 and TM2 to the overall UT receptor binding pocket is discussed below.

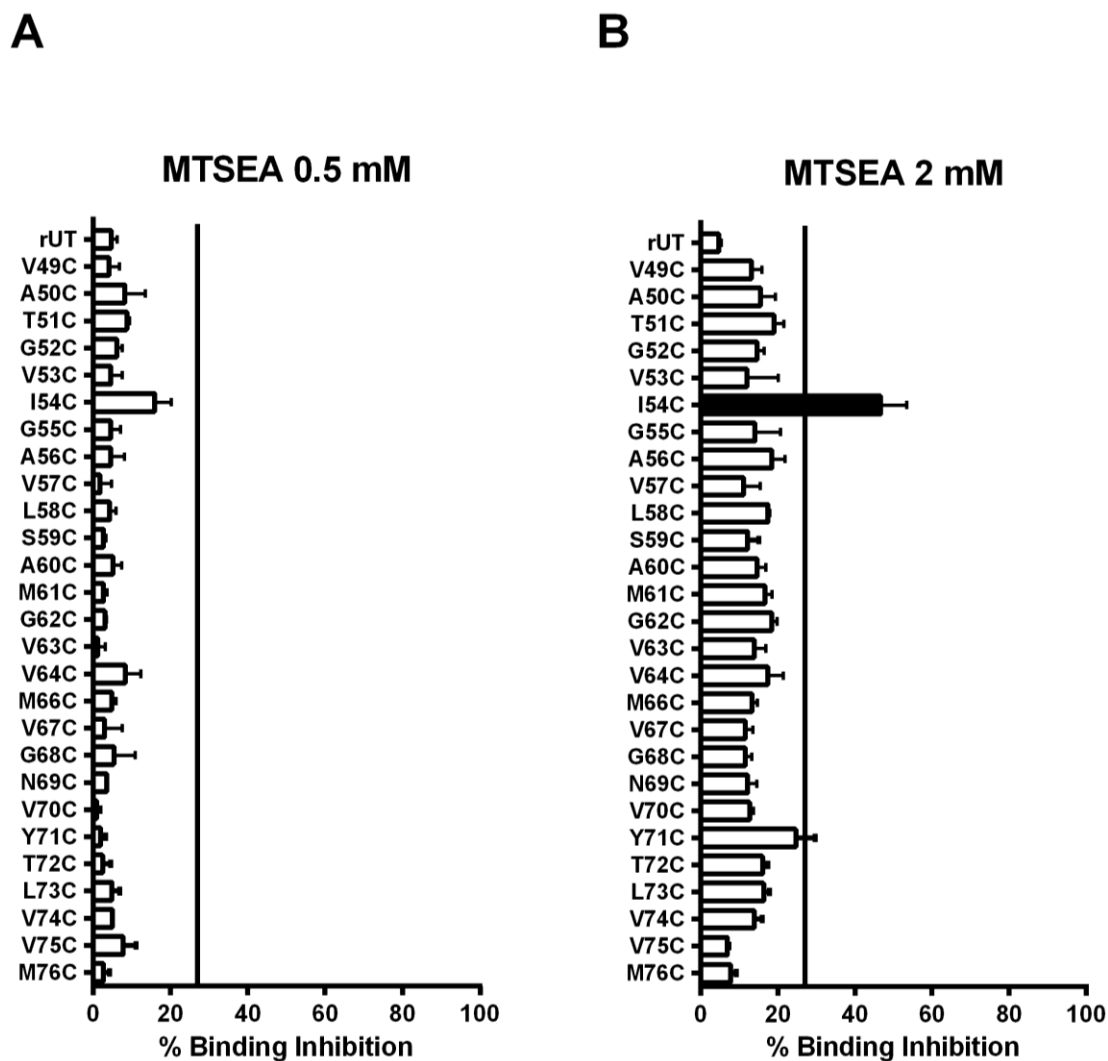


Fig. 3. Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM1. Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TM1 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.05 nM 125 I-UUI. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants and was set at a value corresponding to binding inhibition 20% greater than that of the wild-type rUT receptor. The white bars indicate mutant receptors for which binding activities were not appreciably reduced compared to the wild-type receptor after MTSEA treatment. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean \pm SEM of results from at least three independent experiments.

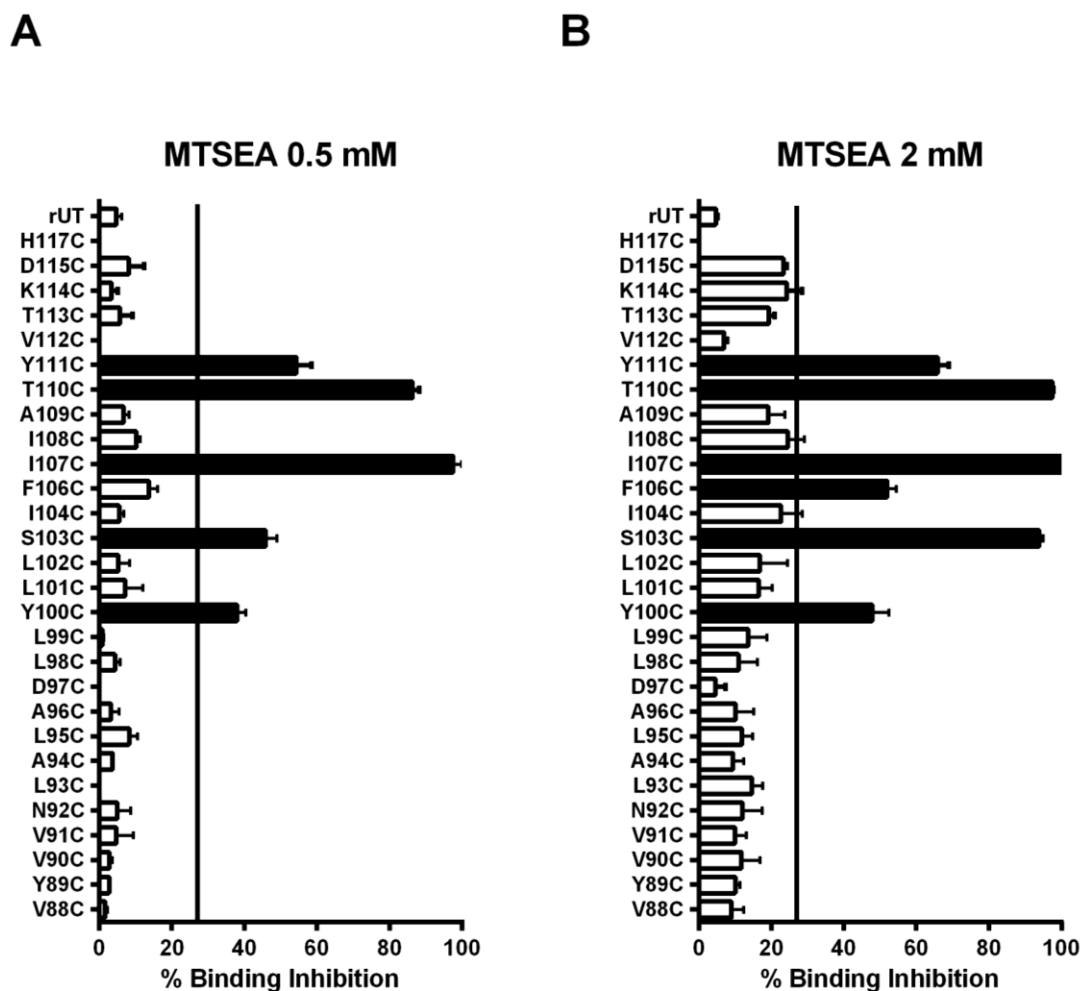


Fig. 4. Effects of MTSEA on rUT receptor mutants bearing a reporter cysteine in TM2. Intact COS-7 cells transiently expressing the wild-type or TM2 mutant rUT receptors were incubated for 3 min at room temperature with 0.5 mM MTSEA (A) or 2 mM MTSEA (B). The intact cells were then incubated for 90 min at room temperature with 0.05 nM 125 I-UUI. The vertical line represents an arbitrary threshold used to identify cysteine-sensitive mutants. Black bars indicate mutant receptors for which binding activities were reduced after MTSEA treatment. Bars represent the mean \pm SEM of results from at least three independent experiments.

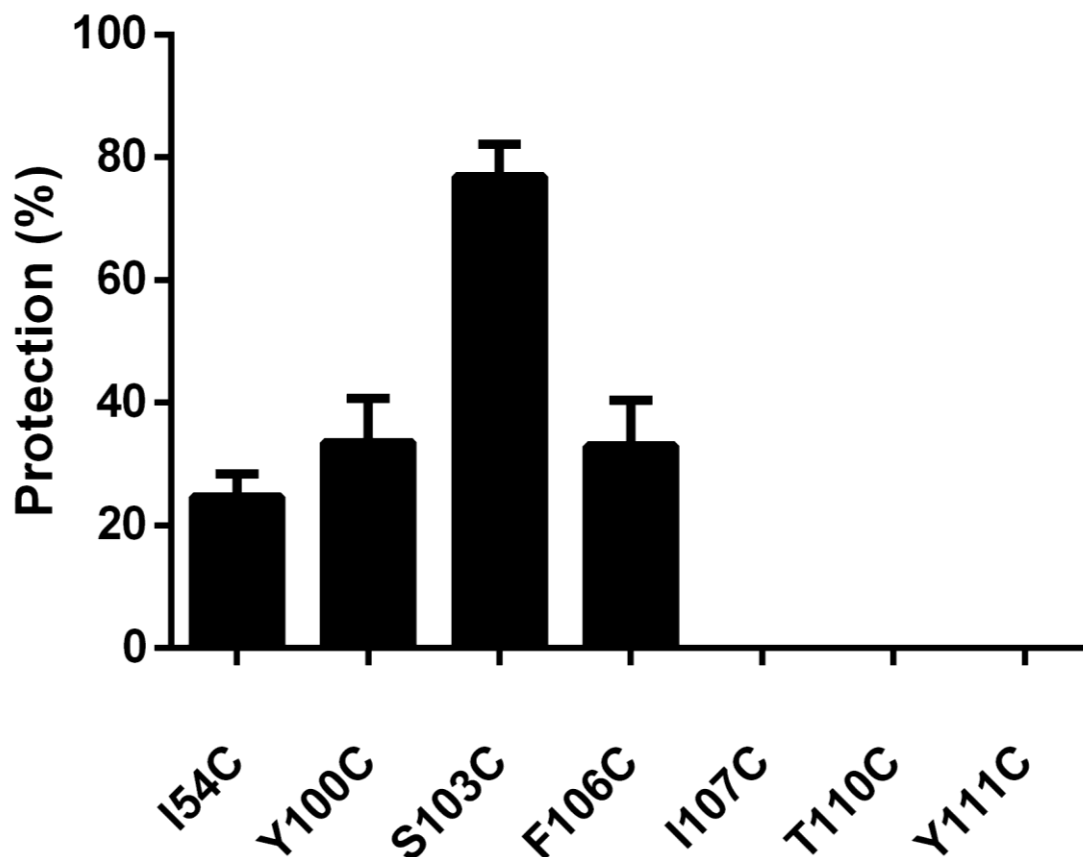


Fig. 5. UII protection of MTSEA-sensitive receptor mutants. Intact COS-7 cells transiently expressing the indicated MTSEA-sensitive rUT receptor mutants were pre-incubated for 1h at 16°C in the absence or presence of 100nM UII. The cells were then washed with PBS to remove excess ligand and treated with 2mM MTSEA to achieve maximal binding inhibition of each receptor. The cells were then washed with ice-cold PBS and incubated for 3h at 16°C with 0.05 nM 125 I-UII. The degree of protection was calculated as described in Materials and Methods. Bars represent the mean \pm SEM of results from at least three independent experiments.

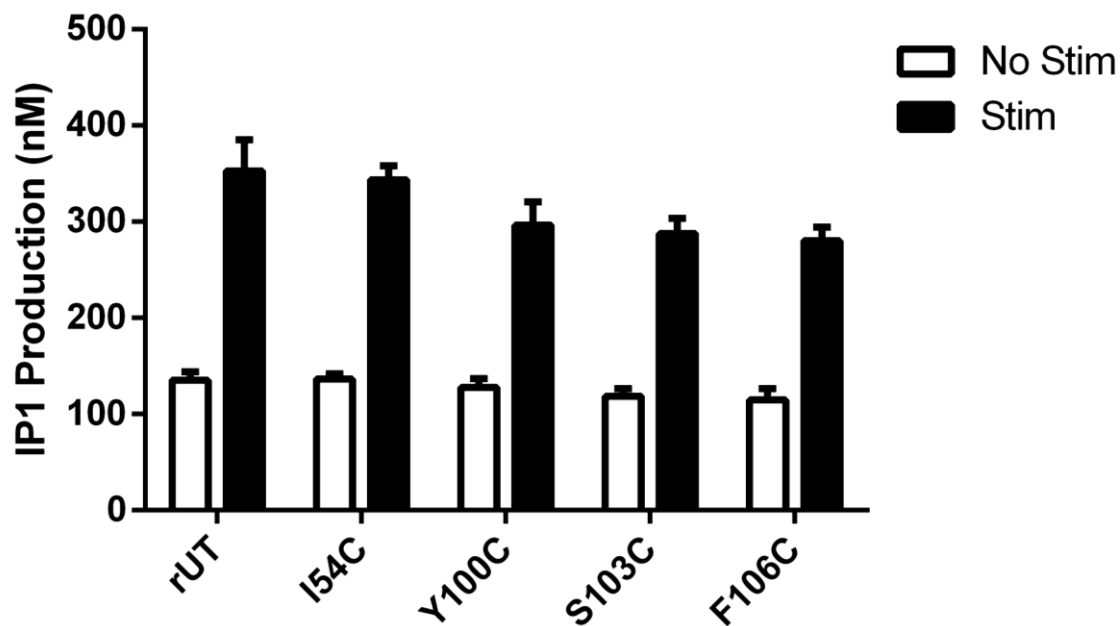


Fig. 6. Functional property of SCAM-positive receptor mutants. Intact COS-7 cells expressing the protected MTSEA-sensitive rUT receptor mutants were stimulated in the presence or absence of 1 μ M UII. IP₁ accumulation was assessed using the IP-One HTRF assay to measure G α_q -coupled receptor activation. Bars represent the mean \pm SEM of results from at least three independent experiments.

4. DISCUSSION

The rationale of this study, which relied on SCAM analysis, was to gain an insight into the orientation of TM1 and TM2 residues within the binding pocket of the rUT receptor. Using this approach, we had previously identified residues in TM3, TM4, TM5, TM6 and TM7 that participated in the formation of the rUT receptor binding pocket [34,36]. The SCAM method is based on the reactivity of engineered cysteines to MTSEA, a reagent that reacts 10^9 times faster with ionized thiol compared to un-ionized thiol [28] and covalently alkylates any cysteine located in a hydrophilic environment. Indeed lipid-exposed, buried, or disulfide-bonded cysteines are unlikely to ionize to a significant extent and hence are assumed to be unaffected by such modification induced by MTSEA. The tracer peptide used in our study was the full-length agonist (UII) of the wild-type UT receptor since we felt that it would enable us to identify determinants that might otherwise be missed with smaller peptide or non-peptidic UT receptor ligands.

We initially determined the binding properties of each TM1 and TM2 cysteine mutants in a wild-type background. Most mutants demonstrated binding affinity towards UII, with the exception of G65C^(1.46) in TM1 and P105C^(2.58) and W116^(2.69) in TM2 (Table 1 and 2). Indeed, our results indicate that these three mutants showed greatly reduced cell surface expression compared to the wild-type receptor (Fig.2) that was most likely due to improper receptor maturation and/or folding, although it cannot be excluded that the amino acids that were mutated are not directly involved in ligand recognition. Indeed, since position 1.46, often a glycine at this position, is involved in the potential flexibility of ECL1 in other GPCRs such as those of the opioid receptor family [21], the loss of binding by the G65C^(1.46) mutant was not unexpected. Conversely, studies on the angiotensin II type 1 receptor (AT₁) using the SCAM approach have already shown that replacing the residue position 2.58 alters the binding of the [Sar¹, Ile⁸] AngII peptide with AT₁ as well as with the constitutively active receptor (N111G-AT₁) [51]. Moreover, in other GPCRs such as the nociceptin/orphanin FQ peptide (NOP) receptor, residue 2.58 is a proline, which

is often implicated in inducing a kink necessary for TM structural integrity [21]. In this context, the loss of binding by the P105C^(2.58) mutant was not unexpected.

The rUT receptor has six endogenous cysteines, two of which are thought to be involved in the putative disulfide bridge linking ECL1 and ECL2. It has been shown that the other endogenous cysteines are not sensitive to MTSEA or that the resulting alkylation does not affect UII binding [34]. Our approach of adding the MTSEA reagent to whole adherent cells expressing the rUT receptor essentially exposed only the extracellular, ligand-accessible side of the receptor. Using SCAM, we identified seven MTSEA-sensitive mutants: one in TM1 (I54C^(1.35)), and six in TM2 (Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64)). This suggests that these residues are part of the rUT receptor binding pocket and alkylation of these residues impedes UII binding.

SCAM analysis revealed that the TM1 cysteine mutant I54C^(1.35) lost his ability to bind ¹²⁵I-UII after MTSEA treatment. Our model and data reveal that residue I54^(1.35) is well positioned towards the interior of the transmembrane bundle (Fig.7 and Fig.8). Previous molecular docking study, revealed that I54^(1.35) is located in the binding cavity of the rUT receptor in complex with the antagonist SB706375 [52]. This suggests that position 1.35 may be involved in formation of the rUT binding pocket.

Our model also reveals four MTSEA-sensitive mutants at the top of TM2 (F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64)) and two in the middle portion of the domain (Y100C^(2.53) and S103C^(2.56)). A recent report has suggested an interaction of antagonists SB706375 and ACT058362 (palosuran) with residues Y100^(2.53), S103^(2.56), I107^(2.60) and Y111^(2.64) in human and rat UT receptor binding pockets [52]. Interestingly, it should be noted that positions 2.53, 2.56, 2.60 and 2.63 have also been shown to contact the antagonist JD_{Tic} bound to the delta (δ -OR) and kappa-opioid (κ -OR) receptors [18,19]. Moreover, in the NOP receptor structure, the analogous residues Q107^(2.60) and D110^(2.63) also contact the small molecule agonist

(SCH-221510) and antagonist (C-24) in complex with the NOP receptor [21]. In chemokine receptors, positions 2.60 and 2.63 have already been shown to contact small molecules such as the antagonist IT1t which binds the CXCR4 receptor [14] or Maraviroc, an HIV entry inhibitor, in the CCR5 receptor [15]. In the crystal structure of the sphingosine-1-phosphate receptor (S1P₁), residue N101 at position 2.60 also contacts an agonist (CYM-5442) and an antagonist (ML056) indicating that position 2.60 may participate in the formation of the binding pocket [53]. Studies using SCAM analysis have already shown that residues in position 2.59 and 2.64 are located in the binding cavity of several GPCRs such as AT₁ receptor and Dopamine (D₂) receptor [51,54]. Taken together, all these data suggest that residues Y100^(2.53), S103^(2.56), F106^(2.59), I107^(2.60), T110^(2.63) and Y111^(2.64) participate in the formation of the binding-site cavity of the rUT receptor.

According to our strategy, only residues that maintained UII binding and MTSEA sensitivity are retained in order to confirm their presence in the binding cavity by protection assays with the natural ligand. The protection of mutants I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56) and F106C^(2.59) from alkylation with UII (Fig.5) supports the notion that those residues are located in the binding pocket of the rUT receptor (Fig.7 and Fig.8). It should be noted that some of those mutants show unchanged K_d values compared to the wild-type rUT receptor (Tables 1 and 2). Furthermore, these mutants produced inositol phosphates at the same level as that of the wild-type rUT receptor after stimulation with UII (Fig.6). These results suggest that introduction of cysteine residues at positions I54^(1.35), Y100^(2.53), S103^(2.56) and F106^(2.59) does not perturb the structure and the functional activity of the receptor. Our model suggests that Y100^(2.53) and S103^(2.56) are in close proximity to the critical residues K8 and Y9 of UII (Fig.7), which would explain how those residues are protected by the peptide in the protection assay. Moreover, in our model, TM1 residue I54^(1.35) is proximal to the extracellular side of TM1 and well oriented toward the binding pocket. Compared to the other MTSEA-sensitive residues, I54^(1.35) is the most distant to UII, which may be the reason why the corresponding mutant's behaviour, I54C^(1.35), was not as well protected by UII as the other mutants.

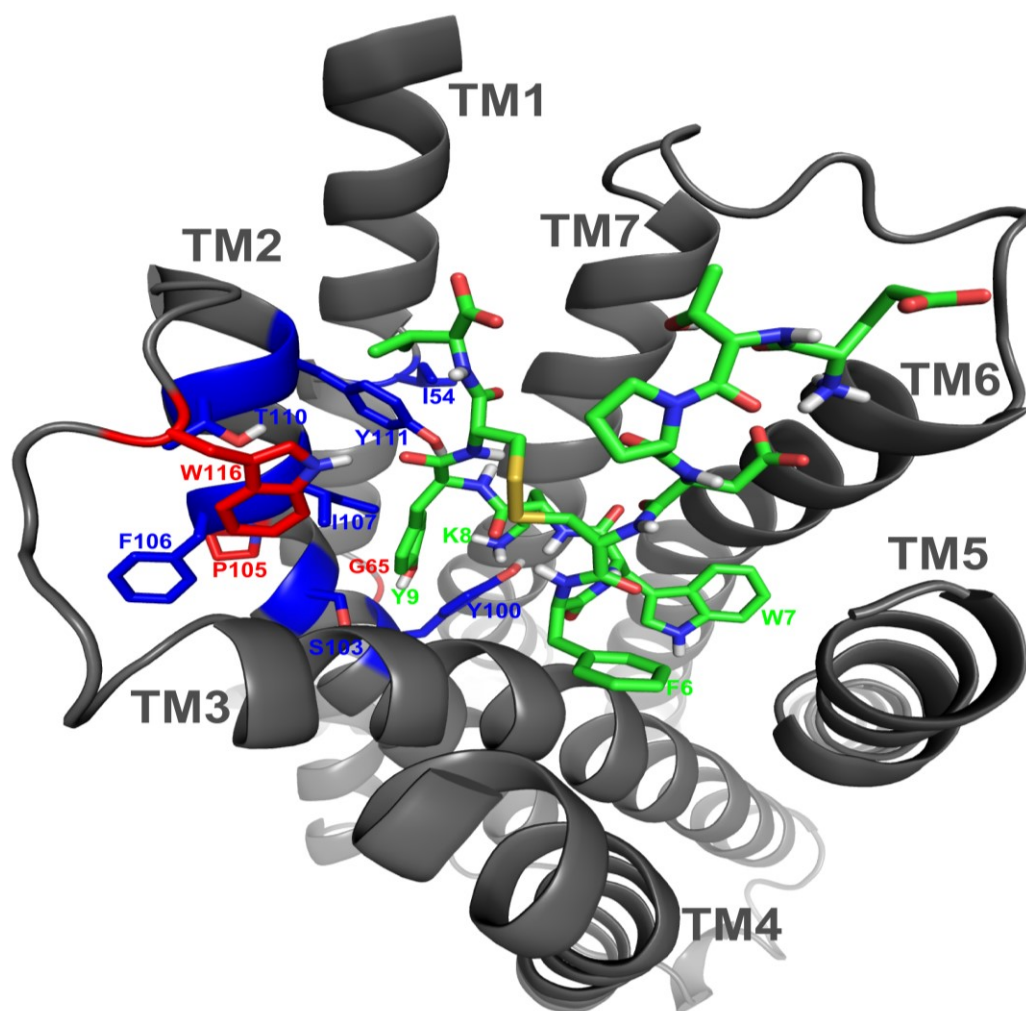


Fig. 7. Molecular model of the UII-liganded rUT receptor. An extracellular view of the seven TMs of rUT receptor based on a multiple-template homology model. The UII ligand is shown in green. MTSEA positive residues I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64) are indicated in blue. Residues G65C^(1.46), P105C^(2.58) and W116C^(2.69), where cysteine substitution caused loss of binding, are indicated in red. The N-terminal domain and ECL2 are hidden to facilitate viewing.

In our model, even though F106^(2.59) faces the exterior of the helix bundle (Fig.7) our results indicate a protective effect on the F106C^(2.59) mutant (Fig.5), suggesting that alkylation of this residue inhibits binding via a mechanism involving an indirect interaction with the receptor. We propose that, in our protection assay, incubation with the agonist (UII) rendering the receptor in an active conformation might favor a reorientation of the side chain toward the binding pocket. Indeed, motions of the receptor at a kink induced by P105^(2.58) could allow residue F106C^(2.59) to transiently reach the binding pocket and explain the MTSEA protective effect by UII. In addition, our results show that although the I107C^(2.60), T110C^(2.63) and Y111C^(2.64) mutants are MTSEA sensitive, pre-incubating these mutants with UII prior to the MTSEA treatment did not have a protective effect. We hypothesize that residues I107^(2.60), T110^(2.63) and Y111^(2.64) may be involved in a network of interactions that are critical for receptor stability and ligand recognition. Indeed, our model suggests that even though I107^(2.60), T110^(2.63) and Y111^(2.64) are found mostly in the extracellular portion of the receptor, these residues are in close proximity to other MTSEA-sensitive residues such as I54^(1.35), Y100^(2.53), S103^(2.56) and F106^(2.59) and may form such a network with these or other residues involved in formation of the binding pocket.

In conclusion, we have identified specific residues in TM1 and TM2 that participate in the formation of the binding pocket of the rUT receptor. Our results suggest that the UT receptor binding pocket shares many similarities with those of previously described class A GPCRs. This study provides a significant advance in our goal to develop a molecular model of the UT receptor and its ligand-binding pocket. Indeed, these results in TM1 and TM2 (I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56)) and those already obtained: F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63), Y111C^(2.64), L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33), M134C^(3.36), M184C^(4.60), I188C^(4.64), F268C^(6.44), W278C^(6.54), V298^(7.34), T302^(7.38) and T303^(7.39) in TM3, TM4, TM6 and TM7 [34,36] have allowed us to propose an experimentally validated homology model of the complete binding pocket of rUT receptor (Fig.8). In absence of a crystal structure of UT receptor, this model represents the best platform to integrate the molecular

pharmacology of the receptor, understand the mechanism of ligand binding and rationally design new relevant ligands that could potentially be therapeutically useful.

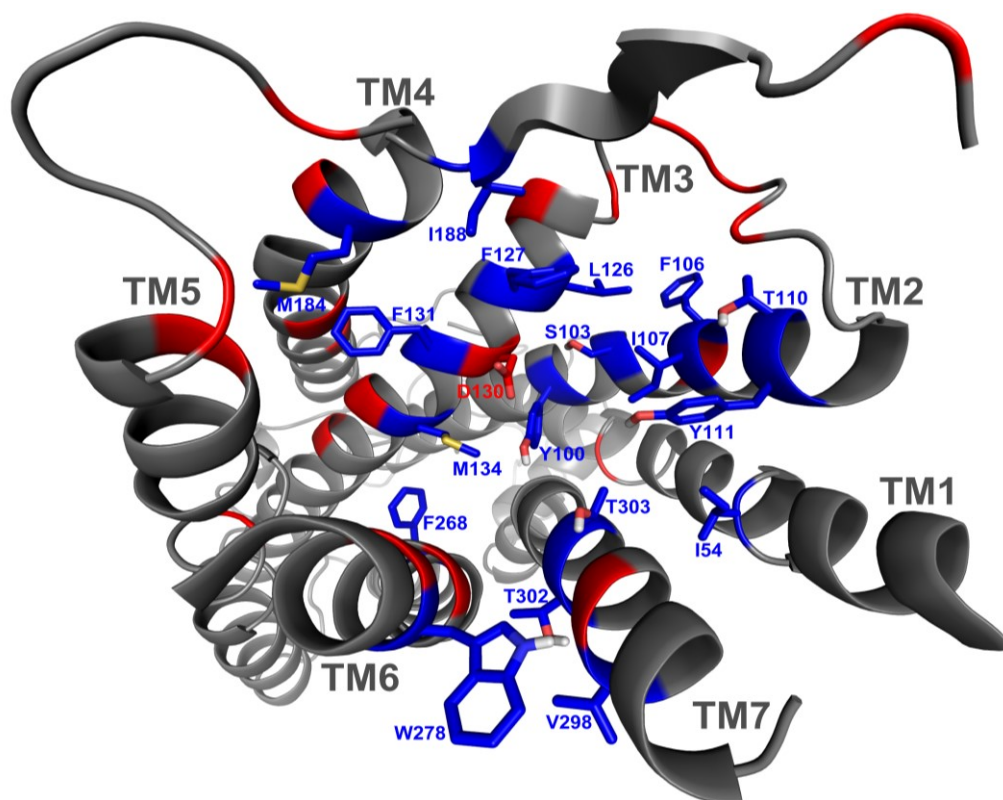


Fig. 8. Molecular model of the rUT receptor binding pocket. An extracellular view of the seven TMs of rUT receptor based on a multiple-template homology model. MTSEA positive residues I54C^(1.35), Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63), Y111C^(2.64), L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33), M134C^(3.36), M184C^(4.60), I188C^(4.64), F268C^(6.44), W278C^(6.54), V298^(7.34), T302^(7.38) and T303^(7.39), located between TMs 1,2,3,4,5,6 and 7 are indicated in blue. Residues where cysteine substitution caused loss of binding are indicated in red. The N-terminal domain, ECL3 and a part of ECL2 are hidden to facilitate viewing.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to PL, EE and RL.

REFERENCES

- [1] Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, *et al.* Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980;77:5021-4.
- [2] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, *et al.* Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999;401:282-6.
- [3] Proulx CD, Holleran BJ, Boucard AA, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Mol.Pharmacol.* 2008;74:552-61.
- [4] Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 2006;46:481-519.
- [5] Proulx CD, Holleran BJ, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, Leduc R. Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides* 2008;29:691-9.
- [6] Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S. Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Curr.Med.Chem.* 2012;19:1090-109.
- [7] Ong KL, Lam KS, Cheung BM. Urotensin II: its function in health and its role in disease. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2005;19:65-75.
- [8] Ross B, McKendy K, Giaid A. Role of urotensin II in health and disease. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 2010;298:R1156-72.

- [9] Chatenet D, Nguyen TT, Letourneau M, Fournier A. Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. *Front.Endocrinol.(Lausanne)* 2013;3:174.
- [10] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739-45.
- [11] 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.
- [12] Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, *et al.* Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2008;454:486-91.
- [13] Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 2008;322:1211-7.
- [14] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, *et al.* Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010;330:1066-71.
- [15] Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, *et al.* Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 2013;341:1387-90.
- [16] Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E, *et al.* Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 2013;340:615-9.

- [17] Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, *et al.* Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 2013;340:610-4.
- [18] Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, *et al.* Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 2012;485:400-4.
- [19] Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, *et al.* Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD1c. *Nature* 2012;485:327-32.
- [20] Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, *et al.* Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 2012;485:321-6.
- [21] Thompson AA, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E, *et al.* Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 2012;485:395-9.
- [22] Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, Huang XP, Thompson AA, Cherezov V, *et al.* Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 2014;506:191-6.
- [23] Gayen A, Goswami SK, Mukhopadhyay C. NMR evidence of GM1-induced conformational change of Substance P using isotropic bicelles. *Biochim.Biophys.Acta* 2011;1808:127-39.
- [24] Park SH, Das BB, Casagrande F, Tian Y, Nothnagel HJ, Chu M, *et al.* Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature* 2012;491:779-83.
- [25] Nygaard R, Zou Y, Dror RO, Mildorf TJ, Arlow DH, Manglik A, *et al.* The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell* 2013;152:532-42.

- [26] Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A. Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 1992;258:307-10.
- [27] Javitch JA, Li X, Kaback J, Karlin A. A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:10355-9.
- [28] Javitch JA, Shi L, Liapakis G. Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* 2002;343:137-56.
- [29] Boucard AA, Roy M, Beaulieu ME, Lavigne P, Escher E, Guillemette G, *et al.* Constitutive activation of the angiotensin II type 1 receptor alters the spatial proximity of transmembrane 7 to the ligand-binding pocket. *J.Biol.Chem.* 2003;278:36628-36.
- [30] Fu D, Ballesteros JA, Weinstein H, Chen J, Javitch JA. Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry* 1996;35:11278-85.
- [31] Javitch JA, Ballesteros JA, Weinstein H, 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* 1998;37:998-1006.
- [32] 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.
- [33] 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.

[34] Holleran BJ, Domazet I, Beaulieu ME, Yan LP, Guillemette G, Lavigne P, *et al.* Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochem.Pharmacol.* 2009;77:1374-82.

[35] Boulais PE, Escher E, Leduc R. Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state. *Biochem.Pharmacol.* 2013;85:541-50.

[36] Sainsily X, Cabana J, Boulais PE, Holleran BJ, Escher E, Lavigne P, *et al.* Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochem.Pharmacol.* 2013;86:1584-93.

[37] Rathmann D, Pedragosa-Badia X, Beck-Sickinger AG. In vitro modification of substituted cysteines as tool to study receptor functionality and structure-activity relationships. *Anal.Biochem.* 2013;439:173-83.

[38] Fraker PJ, Speck JC, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide,1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenyl-glycoluril. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1978;80:849-57.

[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. *Receptor Molecular Biology* 1995;25.

[40] Zhang Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins* 2007;69 Suppl 8:108-17.

- [41] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat.Protoc.* 2010;5:725-38.
- [42] Holleran BJ, Beaulieu ME, Proulx CD, Lavigne P, Escher E, Leduc R. Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem.J.* 2007;402:51-61.
- [43] Kutzner C, Czub J, Grubmuller H. Keep It Flexible: Driving Macromolecular Rotary Motions in Atomistic Simulations with GROMACS. *J.Chem.Theory Comput.* 2011;7:1381-93.
- [44] Jorgensen WL, Tirado-Rives J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* 1988;110 (6).
- [45] Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118 (45).
- [46] Kaminski GA, Friesner RA, Tirado-Rives J, Jorgensen WL. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *The journal of physical chemistry. B* 2001;105 (28).
- [47] Tsui V, Case DA. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* 2000;56:275-91.
- [48] Boucard AA, Sauve SS, Guillemette G, Escher E, Leduc R. Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem.J.* 2003;370:829-38.

[49] Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Auriemma L, Sala M, *et al.* New insight into the binding mode of peptide ligands at Urotensin-II receptor: structure-activity relationships study on P5U and urantide. *J.Med.Chem.* 2009;52:3927-40.

[50] Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J.Biomol.NMR* 1996;8:477-86.

[51] 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.

[52] Kim SK, Li Y, Park C, Abrol R, Goddard WA,3rd. Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations. *ChemMedChem* 2010;5:1594-608.

[53] Hanson MA, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 2012;335:851-5.

[54] Javitch JA, Ballesteros JA, Chen J, Chiappa V, Simpson MM. Electrostatic and aromatic microdomains within the binding-site crevice of the D2 receptor: contributions of the second membrane-spanning segment. *Biochemistry* 1999;38:7961-8.

DISCUSSION

Avec pas moins de 800 membres connus, les GPCR représentent la plus importante famille de protéines exprimées chez l'humain et il n'est donc pas étonnant de constater que plus de 30% des médicaments sur le marché ciblent aujourd'hui des GPCR de la classe A (Overington *et al.*, 2006; Katritch *et al.*, 2013). Cette famille de protéines, capable de réagir à une grande diversité de ligands, est impliquée dans de nombreux processus biologiques responsables de l'homéostasie de l'organisme et leur dysfonctionnement peut engendrer diverses pathologies (Smit *et al.*, 2007). Selon l'OMS, depuis 2008, les maladies du système cardiovasculaire constituent la principale cause de mortalité dans le monde, faisant ainsi des GPCR impliqués dans ce système des cibles d'intervention privilégiées (<http://www.who.int/en/>). L'identification des déterminants moléculaires impliqués dans la reconnaissance du ligand endogène pour son récepteur fait donc l'objet d'études majeures. Au niveau cardiovasculaire, de nombreuses études ont démontré un rôle physiologique, mais aussi pathophysiologique chez l'humain, du système urotensinergique (Douglas *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2010). Ces observations ont donc conduit plusieurs groupes de recherche, dont le nôtre, à s'intéresser au système UII/UT afin de comprendre le mécanisme par lequel l'UII peut reconnaître et lier son récepteur UT. Ceci dans le but de développer des ligands plus puissants, plus sélectifs et avec des propriétés pharmacologiques adéquates pour cibler efficacement un dysfonctionnement du système urotensinergique.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont grandement contribué à la compréhension de la structure et la fonction des GPCR dans divers systèmes biologiques. Jusqu'à très récemment, la grande majorité de ces études ne concernait que les récepteurs de la rhodopsine et le récepteur β 2-adrénérgique qui ne lient que de très petites molécules. Les récepteurs peptidergiques ont pour leur part des ligands de masse moléculaire plus élevée augmentant par conséquent les degrés d'interactions de ces ligands avec leurs récepteurs. Malgré l'avènement de la cristallographie, on ne dénote que très peu de GPCR peptidergiques ayant été cristallisés en présence de leur ligand endogène. Ceci est en grande partie dû à la complexité des interactions permettant de stabiliser le complexe

ligand/récepteur. Le récepteur UT illustre très bien cette problématique, c'est pour cela qu'au cours de mes études doctorales, j'ai procédé à la caractérisation de la pochette de liaison du récepteur UT avec l'urotensine II. Le but de mon étude étant de mieux comprendre le mécanisme de liaison et d'activation de ce récepteur UT, afin d'établir un schéma d'interaction hormone-récepteur pour les GPCR peptidergiques. Pour atteindre cet objectif, la méthode la plus efficace serait de déterminer la structure tridimensionnelle du récepteur UT en complexe avec l'UII par cristallographie aux rayons X. Néanmoins, ces techniques ne sont pas à la portée de tous les laboratoires, il est encore aujourd'hui techniquement très difficile d'obtenir des quantités suffisantes de récepteurs purifiés dans un état stable, indispensable à la cristallisation.

Malgré ces avancées, il faut encore envisager des moyens alternatifs pour obtenir des informations pertinentes sur la nature des déterminants impliqués dans la liaison et l'activation des GPCR. Nous avons donc opté pour la méthode de SCAM (*Substituted-Cysteine Accessibility Method*), afin d'obtenir des informations sur l'orientation des résidus des TM1, TM2, TM3, TM4 et TM5 à l'intérieur de la pochette de liaison du récepteur UT. En utilisant cette approche biochimique, nous avons précédemment identifié les résidus Phe268^(6.44), Trp278^(6.54), Val298^(7.34), Thr302^(7.38) et Thr303^(7.39) des TM6 et TM7 participant à la formation de cette pochette de liaison (Holleran *et al.*, 2009). Le SCAM est une technique biochimique basée sur l'utilisation d'un réactif alkylant, le MTSEA, ciblant spécifiquement le groupement thiol des résidus cystéines. Ce réactif va réagir jusqu'à 10⁹ fois plus rapidement avec les groupements thiols libres accessibles au solvant, qu'avec les groupements thiols à l'intérieur des TM dans un environnement hydrophobe (Javitch *et al.*, 2002). Le MTSEA va ainsi pouvoir venir alkyler n'importe quel résidu cystéine dans un environnement hydrophile. En effet les cystéines exposées aux lipides, enfouies ou impliquées dans un pont disulfure ne sont pas ionisées et ne seront pas affectées par les modifications induites par le MTSEA.

Le récepteur rUT possède sept résidus cystéines endogènes, deux sont impliquées dans le pont disulfure entre le TM3 et la boucle ECL2, conservé chez les GPCR de la classe A. Parmi les 5 cystéines restantes, il y en a une située au niveau du TM1 (Cys77^(1.58)), une

autre dans le TM6 (Cys271^(6.47)), deux dans le TM7 (Cys304^(7.40) et Cys311^(7.47)) et enfin une située dans le segment C-terminal (Cys339). Nous savons que le récepteur de type sauvage est insensible au MTSEA à des concentrations allant jusqu'à 6 mM (Holleran *et al.*, 2009), nous suggérant ainsi que soit les 7 cystéines endogènes ne sont pas alkylées par le MTSEA ou bien que l'alkylation résultant du traitement MTSEA n'a pas d'incidence sur les propriétés de liaison de l'UII. Nous avons pris le soin au cours de cette étude de traiter des cellules intactes vivantes, ce qui présente plusieurs avantages. En effet, grâce à cela seul le coté extracellulaire du récepteur est accessible au traitement par le réactif MTSEA, excluant ainsi la possibilité d'alkyler une cystéine à partir du côté intracellulaire du récepteur. L'autre avantage réside dans le fait que cette méthode va nous permettre de récolter des informations structurales directement à partir de cellules vivantes, rapprochant ainsi notre étude du comportement « naturel » du récepteur UT. De plus, le peptide traceur utilisé tout au long de cette étude est l'urotensine II humaine, nous évitons ainsi le risque de manquer des déterminants importants via l'utilisation de plus petites molécules ou d'un ligand non peptidique du système urotensinergique.

Avant de procéder aux expériences de SCAM, nous avons d'abord évalué la capacité de chacun des mutants cystéines à lier l'UII. Ainsi, compte tenue de la méthode de liaison, il est acquis que le récepteur muté est bien exprimé à la surface cellulaire et que la chaîne latérale de la cystéine substituant un résidu est orientée sensiblement de la même façon que celle du résidu natif. Toutefois, il ne faut pas écarter le fait qu'il soit possible que cette mutation ait touché à la stabilité de la structure globale du récepteur, ou bien que le résidu muté soit directement impliqué dans la liaison avec le ligand. Les propriétés de liaison de chacun des mutants des TM1, TM2, TM3, TM4 et TM5 ont été mesurées par radioliasion à l'aide du ligand radiomarqué [¹²⁵I]UII. Par comparaison avec le récepteur de type sauvage, on observe que la plupart de ces mutants démontrent des capacités de liaison avec une bonne affinité pour le ligand ¹²⁵I-UII, à l'exception des mutants G65C^(1.46) du TM1, des mutants P105C^(2.58) et W116C^(2.69) du TM2, F118C^(3.20), G119C^(3.21), D120C^(3.22), G122C^(3.24), R124C^(3.26), D130C^(3.32) et F139C^(3.41) du TM3, W174C^(4.50), A177C^(4.53), P183C^(4.59), G194C^(4.70) du TM4 et enfin les mutants W203C^(5.30), H208C^(5.35), Y211C^(5.38), T218C^(5.45) et P223C^(5.50) du TM5. Nous avons ensuite mesuré l'expression de surface de

ces différents mutants par ELISA, et nous avons remarqué qu'à l'exception du mutants D130C^(3.32), tous ces mutants montrent une très faible expression de surface comparée au récepteur de type sauvage. Ceci serait vraisemblablement dû à un problème de maturation ou de repliement de ces récepteurs mutés. Cependant, en dépit de leurs faibles expressions, il ne faut pas exclure que ces résidus ayant été mutés ne soient pas directement impliqués dans la reconnaissance du ligand. Il est très intéressant de noter que le mutant D130C^(3.32) malgré son incapacité à fixer l'UII conserve une expression de surface comparable à celle du récepteur de type sauvage. Ce résultat suggère fortement que ce résidu aspartate en position 3.32 est indispensable à la liaison de l'UII sur le récepteur UT, la mutation à cette position ne modifiant que la capacité de liaison sans altérer l'expression à la membrane de ce mutant. Ceci dit, la perte de liaison du mutant D130C^(3.32) n'est pas si surprenante que cela, puisque le résidu 3.32 occupe une position clé dans la liaison de plusieurs GPCR avec leurs effecteurs respectifs comme le récepteur de l'adénosine A_{2A} ou le récepteur D3 dopaminergique (Jaakola *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2010). En effet, de nombreuses études ont montré que la mutation de ce résidu aspartate provoquait une diminution des propriétés de liaison de plusieurs ligands aminergiques protonés ou peptidiques avec leurs récepteurs respectifs (Rosenbaum *et al.*, 2007; Warne *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2012).

En observant de plus près les autres mutants des TM1, 2, 3, 4 et 5 ayant perdu leurs capacités de liaison envers l'UII, on note la présence des mutants modifiés en position 4.50 et 5.50. Pour rappel, ces deux résidus Trp174^(4.50) et Pro223^(5.50) sont hautement conservés à travers les GPCR de la classe A. La perte de liaison des mutants W174C^(4.50) et P223C^(5.50) du TM4 et du TM5 est donc moins étonnante. Toujours dans le TM5, on note que la position 5.38 a déjà été identifiée comme étant un point de contact pour plusieurs GPCR, dont le récepteur β2-adrénergique et le récepteur de l'adénosine A_{2A} (Rosenbaum *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2011b). Il en est de même pour la position 5.30 au sein du récepteur A_{2A}, ce qui peut expliquer cette perte de liaison observée pour les mutants W203C^(5.30) et Y211C^(5.38) (Jaakola *et al.*, 2008). Dans le TM1 cette fois, si on se concentre sur le mutant G65C^(1.46), il s'avère que cette position 1.46, très souvent une glycine, est impliquée dans la flexibilité de la boucle ECL1 des récepteurs opioïdes (Thompson *et al.*, 2012), ce qui peut expliquer là aussi la perte de liaison du mutant G65C^(1.46). Il est bon de

noter que des études de SCAM portant sur le récepteur de l'angiotensine II (AT₁) ont révélé que le traitement au MTSEA sur le résidu proline en position 2.58 muté en cystéine dans le TM2 bloquait la liaison du peptide [Sar¹, Ile⁸]AngII avec AT₁, ainsi que le récepteur muté constitutivement actif (N111G- AT₁) (Domazet *et al.*, 2009a). De plus, il apparaît que chez d'autres GPCR cristallisés, comme le récepteur à la nociceptine/orphanine FQ (NOP), le résidu en position 2.58, est une proline impliquée dans l'induction d'un "kink" nécessaire à l'intégrité structurale du TM2 (Thompson *et al.*, 2012). Ceci pourrait expliquer l'incapacité du mutant P105C^(2.58) à lier l'UII.

Conformément à notre stratégie d'étude, seuls les résidus capables de maintenir leur liaison pour l'UII sont retenus pour les études de SCAM. Ainsi, si après traitement au MTSEA, le récepteur muté n'est plus capable de lier l'UII, ceci se traduira par une accessibilité de la cystéine introduite au milieu hydrophile contenant l'agent alkylant. Cette technique nous permettra donc de sonder les résidus des TM1, 2, 3, 4 et 5 afin d'identifier les mutants accessibles au traitement et par conséquent vraisemblablement présents à l'intérieur de la pochette de liaison. À l'aide de cette technique, nous avons identifié 13 mutants sensibles au MTSEA : un dans le TM1 (I54C^(1.35)), six dans le TM2 (Y100C^(2.53), S103C^(2.56), F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) et Y111C^(2.64)), quatre dans le TM3 (L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) et M134C^(3.36)) et deux dans le TM4 (M184C^(4.60) et I188C^(4.64)) (Figure 13). Ces résultats suggèrent ainsi que l'ensemble de ces résidus font partie de la pochette de liaison du récepteur rUT et que l'alkylation de ces résidus mutés empêche la liaison de l'UII. Si l'on s'intéresse plus particulièrement au TM1, notre modèle et nos résultats révèlent que le résidu Ile54^(1.35) est bien positionné à l'intérieur de la pochette de liaison au niveau des domaines transmembranaires. Il faut savoir que des études précédentes de "docking moléculaire" avaient révélé que le résidu Ile54^(1.35) était localisé dans la pochette de liaison du récepteur rUT en complexe avec l'antagoniste SB706375 (Kim *et al.*, 2010). Ces données confortent donc notre résultat selon lequel la position 1.35 serait importante et impliquée dans la formation de la pochette de liaison du récepteur rUT.

Lorsque l'on compare nos résultats de SCAM portant sur le TM2 avec notre modèle moléculaire, on observe que la position de quatre des six mutants sensibles au MTSEA sont situés au sommet du TM2 (F106C^(2.59), I107C^(2.60), T110C^(2.63) et Y111C^(2.64)) et les deux autres sont situés dans la portion médiane (Y100C^(2.53) et S103C^(2.56)) (Figure 13). Cette même étude de docking suggérait d'ailleurs une interaction des antagonistes SB706375 et ACT58362 (palosuran) avec les résidus Tyr100^(2.53), Ser103^(2.56), Ile107^(2.60) et Tyr111C^(2.64) à l'intérieur de la pochette de liaison des récepteurs hUT et rUT (Kim *et al.*, 2010). De manière intéressante, les positions 2.53, 2.56, 2.60 et 2.63 ont déjà été démontrées comme pouvant interagir avec l'antagoniste JD1c et les récepteurs peptidergiques delta et kappa-opioïdes (Granier *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Par ailleurs, la structure du récepteur NOP, de la même famille de récepteurs aux opiacés, nous indique que les résidus analogues Gln107^(2.60) et Asp110^(2.63), sont eux aussi en contact avec l'agoniste (SCH-221510) et l'antagoniste (C-24) (Thompson *et al.*, 2012). Si on prend l'exemple des récepteurs peptidergiques aux chimiokines, ces positions 2.60 et 2.63 ont été, elles aussi, déjà identifiées comme point de contact avec l'antagoniste IT1t et le récepteur CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). Il en est de même pour le Maraviroc, un inhibiteur de l'entrée du VIH, spécifique au récepteur CCR5 (Tan *et al.*, 2013). La structure cristalline du récepteur à la sphingosine-1-phosphate (S1P₁) nous indique également que le résidu Asn101 à la position 2.60 est aussi en contact avec l'agoniste CYM-5442 ainsi que l'antagoniste ML056, indiquant que cette position 2.60 serait susceptible de participer à la formation de la pochette de liaison du récepteur UT (Hanson *et al.*, 2012). Des études précédentes de SCAM ont également déjà démontré que les résidus aux positions 2.59 et 2.64 sont localisés dans la pochette de liaison de plusieurs GPCR, dont le récepteur AT₁ et le récepteur D2 dopaminergique (Domazet *et al.*, 2009b; Javitch *et al.*, 1999). En résumé, tous ces résultats de SCAM du TM2, nous suggèrent que les résidus Tyr100^(2.53), Ser103^(2.56), Phe106^(2.59), Ile107^(2.60), Thr110^(2.63) et Tyr111^(2.64) sont susceptibles de participer à la pochette de liaison du récepteur rUT, en accord avec les structures cristallines connues.

En se focalisant sur le TM3 du récepteur UT, on remarque que le traitement au MTSEA a aussi permis de démontrer que les mutants cystéines L126C^(3.28), F127C^(3.29), F131C^(3.33) et M134C^(3.36) ont perdu leurs capacités de liaison après alkylation. Notre

modèle nous indique que les résidus Phe131^(3.33) et Met134^(3.36) sont tous les deux bien positionnés à l'intérieur des domaines transmembranaires et situés profondément au sein de la pochette de liaison par rapport aux autres mutants (Figure 13). Ces résultats corroborent de des études antérieures de docking (Kim *et al.*, 2010), suggérant également que les résidus Leu126^(3.28), Phe127^(3.29), Phe131^(3.33) et Met134^(3.36) sont bien localisés dans la pochette de liaison du récepteur UT. La structure cristalline du récepteur β 2-adrénérique nous indique que ces résidus analogues interagissent avec l'agoniste inverse carazolol ainsi que l'agoniste BI-167107 (Rosenbaum *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2011b). Les positions 3.28, 3.29 et 3.33 ont aussi été identifiées comme point de contact avec l'agoniste CXCL12 et l'antagoniste CVX15 du récepteur CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). De plus, les résidus Phe106^(3.28), Val111^(3.33) et Cys114^(3.36) du récepteur D3 dopaminergique sont eux aussi en contact avec l'antagoniste spécifique-D2R/D3R, l'eticlopride (Chien *et al.*, 2010). D'autres études de docking moléculaire portant sur le super-agoniste P5U ([Pen⁵] hUII(4–11)) et l'antagoniste urantide ([Pen⁵,D-Trp⁷,Orn⁸] hUII(4–11)) ont révélé que la position 7 de ces deux ligands, interagissait directement avec les résidus Phe131^(3.33) et Met134^(3.36) du TM3 (Grieco *et al.*, 2009). De plus, cette même étude révèle que le résidu Tyr⁹ de ces deux ligands interagirait quant à lui avec les résidus Leu126^(3.28) et Phe127^(3.29) (Grieco *et al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les positions 3.28, 3.29, 3.33 et 3.36 du TM3 participeraient à la formation de la pochette de liaison et pourraient entrer en contact aussi bien avec des agonistes que des antagonistes.

Si l'on se concentre maintenant sur les résidus du TM4, notre modèle nous indique que les positions des deux mutants sensibles au MTSEA M184C^(4.60) et I188C^(4.64) font face à la pochette de liaison (Figure 13). Lors de précédents travaux, nous avons trouvé à l'aide d'analogues photo-activables de l'UII que les résidus M184/M185 constituaient un site de contact sur le récepteur rUT (Boucard, *et al.*, 2003; Holleran *et al.*, 2007). À la vue de nos résultats de SCAM, il apparait que seul le résidu Met184^(4.60) soit un résidu clé dans la pochette de liaison du ligand. Ces résultats obtenus précédemment renforcent donc nos résultats de SCAM et nous permettent par la même occasion de prouver la validité de notre modèle du récepteur UT (Figure 13). Une étude de docking suggère par ailleurs l'importance des résidus en position 4.60 et 4.64, à l'intérieur de la pochette de liaison du

récepteur UT. En effet, cette analyse montre que le résidu Phe⁶ du P5U et de l'Urantide interagirait directement avec les résidus Met184^(4.60) et Ile188^(4.64) du TM4 (Grieco *et al.*, 2009), comme suggérés par nos résultats de SCAM. Il faut aussi noter que le résidu Met184^(4.60) tient un rôle dans la sélectivité de liaison de certaines molécules entre les récepteurs hUT et rUT (Kim *et al.*, 2010). Il existe en effet une variabilité interspèce selon laquelle le palosuran, un antagoniste non peptidique, est nettement plus sélectif pour l'humain par rapport au rat. Ceci serait en partie dû à cet acide aminé en position 4.60, qui chez l'humain est une valine, tandis que chez le rat il s'agit d'un résidu méthionine. Il a été également démontré que la capacité de liaison du récepteur rUT était réduite lorsque le résidu Met184^(4.60) était muté en valine (Kim *et al.*, 2010). De plus des études sur le récepteur CXCR4 ont également mis en évidence que le résidu en position 4.60 est impliqué dans la pochette de liaison de ce récepteur peptidergique (Wu *et al.*, 2010; Boulais *et al.*, 2013). Tous ces résultats analysés ensemble nous indiquent que les résidus Met184^(4.60) et Ile188^(4.64) pourraient bien eux aussi participer et jouer un rôle important dans la pochette de liaison du récepteur rUT.

Au cours de travaux précédents, nous avons émis l'hypothèse d'une participation du TM5 à l'activation du récepteur rUT (Holleran *et al.*, 2007), comme c'est le cas dans d'autres GPCR comme le récepteur AT1 (Domazet *et al.*, 2009b), le récepteur H1 de l'histamine (Sansuk *et al.*, 2011), le récepteur A_{2A} de l'adénosine ainsi que le récepteur β₂-adrénergique (Deupi et Standfuss, 2011). Néanmoins, aucune perte de liaison avec l'UII n'a été détectée suivant le traitement au MTSEA pour l'ensemble des mutants cystéines du TM5. À première vue, ceci suggère que le TM5 ne participerait pas à la formation de la pochette de liaison du récepteur rUT à l'état inactif. Cette hypothèse semble se confirmer à la vue de notre modèle moléculaire, montrant bien un éloignement du TM5 par rapport à la pochette de liaison formée par les autres TM. De façon intéressante, en analysant de plus près notre modèle moléculaire, il nous apparaît un certain nombre d'interactions entre le ligand UII et le récepteur rUT. En effet, notre modèle suggère des interactions avec entre autres le résidu Asp⁴ de l'UII avec la position His208^(5.35) et le résidu Phe⁶ avec les positions Trp203^(5.30) et Tyr211^(5.38) au niveau du récepteur (Figure 13). Il est intéressant de noter que ces positions correspondent aux mutants H208C^(5.35), W203C^(5.30) et Y211C^(5.38),

identifiés comme étant incapables de lier l'UII. Il semblerait donc à la vue de ces résultats que ces trois positions His208^(5.35), Trp203^(5.30) et Tyr211^(5.38) fassent partie de la pochette de liaison du ligand UII et puissent jouer un rôle dans l'intégrité structurale du récepteur UT.

Comme mentionné précédemment, nous avons retenu pour notre étude uniquement les mutants cystéines démontrant une sensibilité au MTSEA. En continuité avec ces travaux, nous avons également vérifié au moyen d'expériences de protection la présence des résidus mutés au sein de la cavité de liaison du récepteur UT. Ainsi, l'UII est ici préincubée 1h avec les récepteurs mutés dans des conditions expérimentales empêchant l'internalisation. Ceci nous permet de juger si la présence du ligand à l'intérieur de la pochette de liaison est capable d'empêcher le traitement MTSEA, traduisant ainsi une proximité des résidus mutés avec l'UII. La protection des mutants I54C^(1.35) dans le TM1, Y100C^(2.53), S103C^(2.56) et F106C^(2.59) dans le TM2, F131C^(3.33) et M134C^(3.36) dans le TM3 et du mutant M184C^(4.60) dans le TM4 de l'alkylation par UII conforte un peu plus l'hypothèse que ces résidus sont localisés dans la pochette de liaison du récepteur UT. Il est bon de noter que la plupart de ces mutants démontrent des propriétés pharmacologiques (K_D et B_{max}) comparables à celles du récepteur rUT de type sauvage. De plus tous ces mutants produisent des inositols phosphates à des niveaux comparables au récepteur de type sauvage après stimulation par UII. Tous ces résultats suggèrent que l'introduction d'une cystéine aux positions Ile54^(1.35), Tyr100^(2.53), Ser103^(2.56), Phe106^(2.59), Phe13^(3.33), Met134^(3.36) et Met184^(4.60) ne perturbe ni la structure, ni la fonctionnalité de ces récepteurs mutés. En inspectant notre modèle, nous pouvons noter que les chaînes latérales à ces positions sont orientées vers le site de liaison. Ainsi ces chaînes latérales sont pleinement accessibles pour alkylation, affectant ainsi la liaison du ligand (Figure 13). Par conséquent, c'est bien l'alkylation par le réactif MTSEA et leur présence à l'intérieur de la pochette, et non la nature de la chaîne latérale, qui va permettre l'inhibition de la liaison.

En analysant de plus près notre modèle moléculaire, celui-ci suggère des interactions entre les positions Tyr100^(2.53) et Ser103^(2.56) du récepteur et les résidus Lys⁸ et Tyr⁹ de l'UII, ainsi que des liaisons hydrophobes entre les résidus Phe⁶ et Trp⁷ de l'UII avec les positions et Met134^(3.36), Met184^(4.60) et Phe131^(3.33) du récepteur UT (Figure 13).

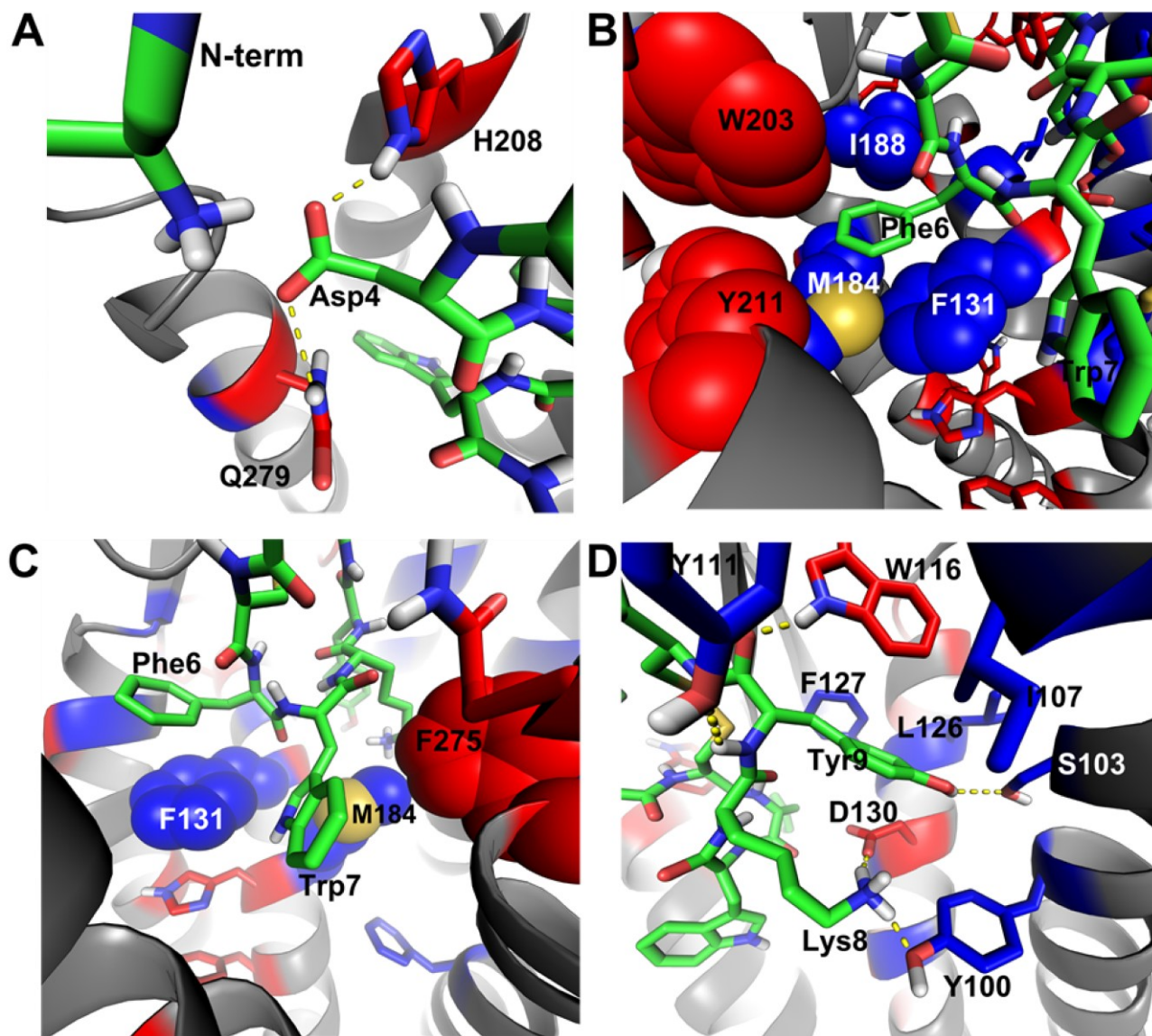


Figure 13. Modélisation moléculaire du complexe ligand récepteur rUT/U11

Organisation structurale de la pochette de liaison du récepteur rUT en complexe l'U11. Images instantanées d'une simulation MD du complexe U11/récepteur rUT montrant les interactions entre les résidus Asp⁴ (A), Phe⁶ (B), Trp⁷ (C) et Lys⁸ et Tyr⁹ (D). Les acides aminés du ligand U11 sont identifiés par le code à trois lettres, tandis que les résidus du récepteur sont identifiés par le code à une lettre des acides aminés. Les résidus positifs au SCAM sont indiqués en bleu et les résidus dont la mutation en cystéine cause une perte de liaison sont indiqués en rouge. Les liaisons hydrogène prédites par PyMol sont indiquées en pointillés jaunes et les chaînes latérales impliquées dans des interactions hydrophobes sont visualisées sous forme de sphères sauf dans l'image (D) afin de faciliter le visuel.

Ces résultats valident et expliquent le fait que les mutants Y100C, S103C, M134C, M184C et F131C soient protégés du traitement MTSEA par le peptide. Notre modèle nous indique également que les résidus Ile54^(1.35) et Leu126^(3.28) sont un peu plus éloignés du ligand UII par rapport aux autres mutants positifs au SCAM. Ceci pourrait là aussi expliquer que les mutants correspondants I54C et L126C ne soient pas très bien protégés par le ligand endogène. Concernant le résidu Phe106^(2.59), de façon surprenante la chaîne latérale de ce résidu fait face à l'extérieur de l'hélice du TM2. Nos résultats semblent tout de même indiquer un effet protecteur du ligand UII envers le mutant F106C^(2.59). Toutes ces observations semblent suggérer que l'alkylation du mutant cystéine, correspondant à ce résidu, inhibera la liaison avec l'UII, via un mécanisme impliquant une interaction indirecte avec le récepteur. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle, dans nos essais de protection, l'incubation avec l'agoniste UII va provoquer un changement conformationnel de la forme inactive à la forme active favorisant une réorientation des chaînes latérales vers la pochette de liaison. Ce mouvement du récepteur apporté par le "*kink*" au niveau du résidu P105C^(2.58) permettrait au résidu Phe106^(2.59) de se repositionner vers la pochette de liaison, expliquant ainsi l'effet protecteur de l'UII sur le MTSEA.

Ces travaux nous ont également permis de démontrer que les mutants I107C^(2.60), T110C^(2.63), Y111C^(2.64), L126C^(3.28), F127C^(3.29) et I188^(4.64), tous sensibles au MTSEA, ne sont pas protégés du traitement malgré une préincubation avec l'UII. Notre hypothèse est que ces résidus participent à un réseau d'interactions, stabilisant la pochette de liaison et ainsi la reconnaissance du ligand. Notre modèle semble appuyer cette hypothèse, puisqu'il nous suggère que l'ensemble de ces résidus sont positionnés au niveau de la portion extracellulaire du récepteur. De plus, tous ces résidus sont à proximité des autres résidus sensibles au MTSEA Ile54^(1.35), Tyr100^(2.53), Ser103^(2.56), Phe106^(2.59), Phe131^(3.33), Met134^(3.36) et Met184^(4.60) identifiés comme interagissant avec UII. Nous pouvons donc imaginer que l'ensemble de ces résidus formait un réseau d'interactions tout autour de la pochette de liaison du récepteur UT et que ce réseau serait déstabilisé par le traitement MTSEA des mutants I107C^(2.60), T110C^(2.63), Y111C^(2.64), L126C^(3.28), F127C^(3.29) et I188C^(4.64).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons démontré que les résidus Ile54^(1.35), Tyr100^(2.53), Ser103^(2.56), Phe106^(2.59), Ile107^(2.60), Thr110^(2.63) et Tyr111^(2.64) des TM1 et TM2, ainsi que les résidus Leu126^(3.28), Phe127^(3.29), Phe131^(3.33), Met134^(3.36), Met184^(4.60), Ile188^(4.64), His208^(5.35), Trp203^(5.30) et Tyr211^(5.38) des TM3, TM4 et TM5 étaient exposés à la cavité hydrophile du récepteur UT. De plus, nous avons validé le fait que la grande majorité de ces résidus sont présents à des positions faisant partie de la pochette de liaison d'autres GPCR de la classe A. Ces travaux renforcent ainsi l'idée selon laquelle les GPCR de la classe A partagent des déterminants moléculaires importants pour le mécanisme de liaison. Il est intéressant de noter que la majorité des résidus sensibles au MTSEA sont à proximité les uns des autres, mais aussi à proximité des résidus-clés Phe⁶, Trp⁷, Lys⁸ et Tyr⁹ du ligand UII. Nos observations permettent également de proposer l'hypothèse de l'existence d'un réseau d'interactions intramoléculaires chez le récepteur UT, nécessaire à l'intégration structurale et au maintien de la pochette de liaison de ce GPCR de la classe A.

Ces dernières années ont été marquées par la découverte de nombreuses structures moléculaires de GPCR, permettant ainsi d'élargir notre compréhension de cette famille de récepteurs. Les travaux présentés dans cette thèse sont en adéquation avec cette philosophie d'élargissement des connaissances, car nous croyons aux potentiels des techniques biochimiques à fournir une information structurale des GPCR dans un contexte cellulaire. En se penchant sur les chiffres, on se rend compte que les structures moléculaires cristallines ne représentent que 4% de l'ensemble des GPCR non olfactifs. Rendant ainsi honneur à l'intérêt porté aux modèles par homologie, validés expérimentalement via des techniques biochimiques ou biophysiques (Shoichet et Kobilka, 2012). En ce sens, il a même été démontré récemment lors d'un criblage virtuel, que le modèle par homologie du récepteur D3 dopaminergique permettait de concevoir davantage de composés spécifiques que la structure cristallographique (Carlsson *et al.*, 2011). Nous savons aujourd'hui qu'il n'existe pas juste un état actif et un état inactif du récepteur, mais bien une multitude de conformations actives ou inactives. Il apparaît très intéressant aujourd'hui de caractériser ces états intermédiaires du récepteur, en utilisant par exemple des récepteurs mutants,

capables de refléter des états où la signalisation serait biaisée (Proulx *et al.*, 2008; Bonde *et al.*, 2010). Dans le même sens, il serait tout aussi pertinent d'identifier des molécules capables de se fixer au site orthostérique ou allostérique du récepteur et de le maintenir dans ce même état intermédiaire. Mes travaux ont contribué à l'identification des résidus constituant la pochette de liaison orthostérique du récepteur rUT. En absence de structure cristalline du récepteur UT, ces résultats, associés à ceux précédemment obtenus (Holleran *et al.*, 2009), nous permettent de proposer un modèle par homologie complet du complexe UII/rUT validé expérimentalement. Cet outil pharmacologique constitue la meilleure plateforme d'étude pour intégrer la pharmacologie moléculaire du récepteur UT. Ceci nous permettra ainsi de mieux comprendre le mécanisme de liaison des récepteurs peptidergiques, mais surtout de concevoir de manière rationnelle de nouveaux ligands avec un potentiel thérapeutique certain.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr. Richard Leduc pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir donné sa confiance, son soutien et son savoir pour mener à bien ce projet. Nos nombreuses discussions et son esprit de synthèse qui saura toujours m'impressionner, m'ont grandement permis de développer mon ouverture d'esprit ainsi que mon sens critique ce qui a fait de moi un meilleur scientifique.

Je voudrais aussi remercier les Drs Alain Fournier, Xavier Roucou et Michel Grandbois pour avoir pris le temps d'évaluer ma thèse.

Je voudrais remercier tous mes collègues et amis qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de recherche : Nicolas Perzo, François et Éric Béliveau, Michael Biet, Dany Fillion, Marie-Reine Lefebvre, Jean-Michel Longpré, Patrice Leclerc, Jérôme Cabana, Cédric Brûlé, Élie Besserer-Offroy, Éloïc Colombo, Stéphanie Rosciglione, Alexandre Murza, Antoine Leroux, Erwan Lanchec, Sébastien Grastilleur, Sébastien Dion, Yannick Miron, Marc Sousbie et Sandrine Lavenus.

Un merci très spécial à Antoine Désilets, Philip Boulais et Brian Holleran pour m'avoir pleinement intégré au sein du laboratoire et pour toutes nos discussions enrichissantes et toujours pertinentes.

J'aimerais remercier aussi ma famille, mes proches ainsi que mes parents Claude et Laurence pour m'avoir encouragé tout au long de mon parcours universitaire.

Cyrielle, merci de partager ta vie avec moi, de m'avoir soutenu et de me soutenir encore aujourd'hui; merci d'avoir fait de moi une meilleure personne et de me permettre d'être le scientifique que je suis aujourd'hui.

LISTES DES RÉFÉRENCES

- Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M. *et al.* (1999). Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*, 401(6750), 282-286.
- Ashton, N. (2006). Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney international*, 70(4), 624-629.
- Attwood, T. K. et Findlay, J. B. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering*, 7(2), 195-203.
- Audet, M. et Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*, 151(1), 14-23.
- Ballesteros, J. A. et Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Receptor Molecular Biology*, 25
- Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U. *et al.* (2001). Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *The Journal of biological chemistry*, 276(31), 29171-29177.
- Behm, D. J., Doe, C. P., Johns, D. G., Maniscalco, K., Stankus, G. P., Wibberley, A. *et al.* (2004). Urotensin-II: A novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(3), 274-280.
- Bergeron, F., Leduc, R. et Day, R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *Journal of molecular endocrinology*, 24(1), 1-22.
- Bern, H. A. et Lederis, K. (1969). A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *The Journal of endocrinology*, 45(1), Suppl:xi-xii.
- Bilodeau, J., Desilets, A., McDuff, F. O., St-Pierre, C., Barbar, E., Leduc, R. *et al.* (2011). Influence of Ca²⁺ and pH on the folding of the prourotesin II precursor. *FEBS letters*, 585(12), 1910-1914.
- Bonde, M. M., Hansen, J. T., Sanni, S. J., Haunso, S., Gammeltoft, S., Lyngso, C. *et al.* (2010). Biased signaling of the angiotensin II type 1 receptor can be mediated through distinct mechanisms. *PloS one*, 5(11), e14135.

- Boucard, A. A., Sauve, S. S., Guillemette, G., Escher, E. et Leduc, R. (2003). Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *The Biochemical journal*, 370(Pt 3), 829-838.
- Boulais, P. E., Escher, E. et Leduc, R. (2013). Analysis by substituted cysteine scanning mutagenesis of the fourth transmembrane domain of the CXCR4 receptor in its inactive and active state. *Biochemical pharmacology*, 85(4), 541-550.
- Bousette, N., Patel, L., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H. et Giaid, A. (2004). Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis*, 176(1), 117-123.
- Brauner-Osborne, H., Wellendorph, P. et Jensen, A. A. (2007). Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Current Drug Targets*, 8(1), 169-184.
- Brelot, A., Heveker, N., Adema, K., Hosie, M. J., Willett, B. et alizon, M. (1999). Effect of mutations in the second extracellular loop of CXCR4 on its utilization by human and feline immunodeficiency viruses. *Journal of virology*, 73(4), 2576-2586.
- Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S. Bourgault, s. et Fournier, A. (2003). Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(3), 1200-1209.
- Brule, C., Perzo, N., Joubert, J. E., Sainsily, X., Leduc, R., Castel, H. et Prezeau L. (2014). Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB journal*, 28(12), 5148-5162.
- Carlsson, J., Coleman, R. G., Setola, V., Irwin, J. J., Fan, H., Schlessinger, A. et al. (2011). Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nature chemical biology*, 7(11), 769-778.
- Chartrel, N., Leprince, J., Dujardin, C., Chatenet, D., Tollemer, H., Baroncini, M. et al. (2004). Biochemical characterization and immunohistochemical localization of urotensin II in the human brainstem and spinal cord. *Journal of neurochemistry*, 91(1), 110-118.
- Chatenet, D., Nguyen, T. T., Letourneau, M. et Fournier, A. (2013). Update on the urotensinergic system: New trends in receptor localization, activation, and drug design. *Frontiers in endocrinology*, 3174.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S. et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5854), 1258-1265.

- Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A. *et al.* (2010). Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6007), 1091-1095.
- Choe, H. W., Kim, Y. J., Park, J. H., Morizumi, T., Pai, E. F., Krauss, N. *et al.* (2011). Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature*, 471(7340), 651-655.
- Chung, K. Y., Rasmussen, S. G., Liu, T., Li, S., DeVree, B. T., Chae, P. S. *et al.* (2011). Conformational changes in the G protein α s induced by the beta2 adrenergic receptor. *Nature*, 477(7366), 611-615.
- Clozel, M., Hess, P., Qiu, C., Ding, S. S. et Rey, M. (2006). The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 316(3), 1115-1121.
- Conlon, J. M., O'Harte, F., Smith, D. D., Tonon, M. C. et Vaudry, H. (1992). Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochemical and biophysical research communications*, 188(2), 578-583.
- Coulouarn, Y., Jegou, S., Tostivint, H., Vaudry, H. et Lihrmann, I. (1999). Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS letters*, 457(1), 28-32.
- Coulouarn, Y., Lihrmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J. C. *et al.* (1998). Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15803-15808.
- Csermely, P., Palotai, R. et Nussinov, R. (2010). Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: An extended view of binding events. *Trends in biochemical sciences*, 35(10), 539-546.
- D'Angelo, D. D., Sakata, Y., Lorenz, J. N., Boivin, G. P., Walsh, R. A., Liggett, S. B. *et al.* (1997). Transgenic galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), 8121-8126.
- Davie, B. J., Christopoulos, A. et Scammells, P. J. (2013). Development of M1 mAChR allosteric and bitopic ligands: Prospective therapeutics for the treatment of cognitive deficits. *ACS chemical neuroscience*, 4(7), 1026-1048.
- DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O. et Bunnett, N. W. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), 11086-11091.

- Deupi, X. et Standfuss, J. (2011). Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Current opinion in structural biology*, 21(4), 541-551.
- Diebold, I., Petry, A., Sabrane, K., Djordjevic, T., Hess, J. et Gorlach, A. (2012). The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *Journal of cell science*, 125(Pt 4), 956-964.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T. *et al.* (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 321(6065), 75-79.
- Domazet, I., Holleran, B. J., Martin, S. S., Lavigne, P., Leduc, R., Escher, E. *et al.* (2009a). 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. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), 11922-11929.
- Domazet, I., Martin, S. S., Holleran, B. J., Morin, M. E., Lacasse, P., Lavigne, P. *et al.* (2009b). 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. *The Journal of biological chemistry*, 284(46), 31953-31961.
- Dore, A. S., Robertson, N., Errey, J. C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B. *et al.* (2011). Structure of the adenosine A(2A) receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure (London, England : 1993)*, 19(9), 1283-1293.
- Dorsam, R. T. et Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews.Cancer*, 7(2), 79-94.
- Douglas, S. A., Dhanak, D. et Johns, D. G. (2004). From 'gills to pills': Urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends in pharmacological sciences*, 25(2), 76-85.
- Douglas, S. A., Sulpizio, A. C., Piercy, V., Sarau, H. M., Ames, R. S., Aiyar, N. V. *et al.* (2000). Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *British journal of pharmacology*, 131(7), 1262-1274.
- Dror, R. O., Arlow, D. H., Borhani, D. W., Jensen, M. O., Piana, S. et Shaw, D. E. (2009). Identification of two distinct inactive conformations of the beta2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4689-4694.

- Dror, R. O., Arlow, D. H., Maragakis, P., Mildorf, T. J., Pan, A. C., Xu, H. *et al.* (2011a). Activation mechanism of the beta2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18684-18689.
- Dror, R. O., Pan, A. C., Arlow, D. H., Borhani, D. W., Maragakis, P., Shan, Y. *et al.* (2011b). Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13118-13123.
- Dubessy, C., Cartier, D., Lectez, B., Bucharles, C., Chartrel, N., Montero-Hadjadje, M. *et al.* (2008). Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: Evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry*, 107(2), 361-374.
- Elshourbagy, N. A., Douglas, S. A., Shabon, U., Harrison, S., Duddy, G., Sechler, J. L. *et al.* (2002). Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *British journal of pharmacology*, 136(1), 9-22.
- Farrens, D. L., Altenbach, C., Yang, K., Hubbell, W. L. et Khorana, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5288), 768-770.
- Federico, A., Zappavigna, S., Romano, M., Grieco, P., Luce, A., Marra, M. *et al.* (2014). Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European journal of clinical investigation*, 44(3), 285-294.
- Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C. et Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: A prospectus. *Annual Review of Physiology*, 65, 851-879.
- Flohr, S., Kurz, M., Kostenis, E., Brkovich, A., Fournier, A. et Klabunde, T. (2002). Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *Journal of medicinal chemistry*, 45(9), 1799-1805.
- Franco, R., Zappavigna, S., Gigantino, V., Luce, A., Cantile, M., Cerrone, M. *et al.* (2014). Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 33, 48-9966-33-48.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. et Muller, C. E. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews*, 63(1), 1-34.

- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. et Schioth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), 1256-1272.
- Fredriksson, R. et Schioth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular pharmacology*, 67(5), 1414-1425.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K. P. et Ernst, O. P. (2003). Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2290-2295.
- George, S. R., O'Dowd, B. F. et Lee, S. P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(10), 808-820.
- Gether, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*, 21(1), 90-113.
- Gether, U. et Kobilka, B. K. (1998). G protein-coupled receptors. II. mechanism of agonist activation. *The Journal of biological chemistry*, 273(29), 17979-17982.
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J. A., Weinstein, H. et Kobilka, B. K. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *The EMBO journal*, 16(22), 6737-6747.
- Gether, U., Lin, S. et Kobilka, B. K. (1995). Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. evidence for ligand-specific conformational changes. *The Journal of biological chemistry*, 270(47), 28268-28275.
- Gibson, A., Wallace, P. et Bern, H. A. (1986). Cardiovascular effects of urotensin II in anesthetized and pithed rats. *General and comparative endocrinology*, 64(3), 435-439.
- Gonzalez-Cabrera, P. J., Jo, E., Sanna, M. G., Brown, S., Leaf, N., Marsolais, D. et al. (2008). Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Molecular pharmacology*, 74(5), 1308-1318.
- Govaerts, C., Lefort, A., Costagliola, S., Wodak, S. J., Ballesteros, J. A., Van Sande, J. et al. (2001). A conserved asn in transmembrane helix 7 is an on/off switch in the activation of the thyrotropin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 276(25), 22991-22999.
- Granier, S. et Kobilka, B. (2012). A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nature chemical biology*, 8(8), 670-673.

- Granier, S., Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Weis, W. I. *et al.* (2012). Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*, 485(7398), 400-404.
- Gregory, K. J., Sexton, P. M. et Christopoulos, A. (2007). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Current neuropharmacology*, 5(3), 157-167.
- Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., Auriemma, L., Sala, M. *et al.* (2009). New insight into the binding mode of peptide ligands at urotensin-II receptor: Structure-activity relationships study on P5U and urantide. *Journal of medicinal chemistry*, 52(13), 3927-3940.
- Guidolin, D., Albertin, G., Oselladore, B., Sorato, E., Rebuffat, P., Mascarin, A. *et al.* (2010). The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regulatory peptides*, 162(1-3), 26-32.
- Guidolin, D., Albertin, G. et Ribatti, D. (2010). Urotensin-II as an angiogenic factor. *Peptides*, 31(6), 1219-1224.
- Gurevich, E. V., Tesmer, J. J., Mushegian, A. et Gurevich, V. V. (2012). G protein-coupled receptor kinases: More than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacology & therapeutics*, 133(1), 40-69.
- Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C. *et al.* (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, 482(7386), 547-551.
- Hammes, G. G., Chang, Y. C. et Oas, T. G. (2009). Conformational selection or induced fit: A flux description of reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13737-13741.
- Hanson, M. A., Cherezov, V., Griffith, M. T., Roth, C. B., Jaakola, V. P., Chien, E. Y. *et al.* (2008). A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure (London, England : 1993)*, 16(6), 897-905.
- Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G. *et al.* (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6070), 851-855.
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F. *et al.* (2012). GENCODE: The reference human genome annotation for the ENCODE project. *Genome research*, 22(9), 1760-1774.
- Heitz, F., Holzwarth, J. A., Gies, J. P., Pruss, R. M., Trumpp-Kallmeyer, S., Hibert, M. F. *et al.* (1999). Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site. *European journal of pharmacology*, 380(2-3), 183-195.

- Hill, S. J. (2006). G-protein-coupled receptors: Past, present and future. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1S27-37.
- Hillier, C., Berry, C., Petrie, M. C., O'Dwyer, P. J., Hamilton, C., Brown, A. *et al.* (2001). Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. *Circulation*, 103(10), 1378-1381.
- Hollenstein, K., de Graaf, C., Bortolato, A., Wang, M. W., Marshall, F. H. et Stevens, R. C. (2014). Insights into the structure of class B GPCRs. *Trends in pharmacological sciences*, 35(1), 12-22.
- Holleran, B. J., Beaulieu, M. E., Proulx, C. D., Lavigne, P., Escher, E. et Leduc, R. (2007). Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *The Biochemical journal*, 402(1), 51-61.
- Holleran, B. J., Domazet, I., Beaulieu, M. E., Yan, L. P., Guillemette, G., Lavigne, P. *et al.* (2009). Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochemical pharmacology*, 77(8), 1374-1382.
- Holloway, A. C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Karnik, S. *et al.* (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular pharmacology*, 61(4), 768-777.
- Hubbell, W. L., Altenbach, C., Hubbell, C. M. et Khorana, H. G. (2003). Rhodopsin structure, dynamics, and activation: A perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Advances in Protein Chemistry*, 63243-290.
- Huber, T., Menon, S. et Sakmar, T. P. (2008). Structural basis for ligand binding and specificity in adrenergic receptors: Implications for GPCR-targeted drug discovery. *Biochemistry*, 47(42), 11013-11023.
- Huitron-Resendiz, S., Kristensen, M. P., Sanchez-Alavez, M., Clark, S. D., Grupke, S. L., Tyler, C. *et al.* (2005). Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(23), 5465-5474.
- Hulme, E. C., Lu, Z. L. et Bee, M. S. (2003). Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors & channels*, 9(4), 215-228.
- Hunyady, L. et Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(5), 953-970.

- Hunyady, L., Vauquelin, G. et Vanderheyden, P. (2003). Agonist induction and conformational selection during activation of a G-protein-coupled receptor. *Trends in pharmacological sciences*, 24(2), 81-86.
- Hurst, D. P., Grossfield, A., Lynch, D. L., Feller, S., Romo, T. D., Gawrisch, K. *et al.* (2010). A lipid pathway for ligand binding is necessary for a cannabinoid G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), 17954-17964.
- Iglewski, M. et Grant, S. R. (2010). Urotensin II-induced signaling involved in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vascular health and risk management*, 6723-734.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R. *et al.* (2008). The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5905), 1211-1217.
- Jaakola, V. P., Lane, J. R., Lin, J. Y., Katritch, V., Ijzerman, A. P. et Stevens, R. C. (2010). Ligand binding and subtype selectivity of the human A(2A) adenosine receptor: Identification and characterization of essential amino acid residues. *The Journal of biological chemistry*, 285(17), 13032-13044.
- Javitch, J. A., Ballesteros, J. A., Chen, J., Chiappa, V. et Simpson, M. M. (1999). Electrostatic and aromatic microdomains within the binding-site crevice of the D2 receptor: Contributions of the second membrane-spanning segment. *Biochemistry*, 38(25), 7961-7968.
- Javitch, J. A., Fu, D., Liapakis, G. et Chen, J. (1997). Constitutive activation of the beta2 adrenergic receptor alters the orientation of its sixth membrane-spanning segment. *The Journal of biological chemistry*, 272(30), 18546-18549.
- Javitch, J. A., Shi, L. et Liapakis, G. (2002). Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods in enzymology*, 343137-156.
- Jegou, S., Cartier, D., Dubessy, C., Gonzalez, B. J., Chatenet, D., Tostivint, H. *et al.* (2006). Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 495(1), 21-36.
- Jensen, A. D., Guarnieri, F., Rasmussen, S. G., Asmar, F., Ballesteros, J. A. et Gether, U. (2001). Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of transmembrane segment 6 in the beta 2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling. *The Journal of biological chemistry*, 276(12), 9279-9290.
- Jiang, Q., Lee, B. X., Glashofer, M., van Rhee, A. M. et Jacobson, K. A. (1997). Mutagenesis reveals structure-activity parallels between human A2A adenosine receptors and biogenic amine G protein-coupled receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 40(16), 2588-2595.

- Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M. *et al.* (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, 396(6712), 674-679.
- Karnik, S. S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y. et Takezako, T. (2003). Activation of G-protein-coupled receptors: A common molecular mechanism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 14(9), 431-437.
- Katritch, V., Cherezov, V. et Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53531-556.
- Kenakin, T. (2002). Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nature reviews.Drug discovery*, 1(2), 103-110.
- Kenakin, T. (2003). Predicting therapeutic value in the lead optimization phase of drug discovery. *Nature reviews.Drug discovery*, 2(6), 429-438.
- Kenakin, T. et Miller, L. J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: The impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacological reviews*, 62(2), 265-304.
- Kim, J., Jiang, Q., Glashofer, M., Yehle, S., Wess, J. et Jacobson, K. A. (1996). Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A2a adenosine receptor are required for ligand recognition. *Molecular pharmacology*, 49(4), 683-691.
- Kim, J., Wess, J., van Rhee, A. M., Schoneberg, T. et Jacobson, K. A. (1995). Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. *The Journal of biological chemistry*, 270(23), 13987-13997.
- Kim, J. M., Altenbach, C., Kono, M., Oprian, D. D., Hubbell, W. L. et Khorana, H. G. (2004). Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12508-12513.
- Kim, S. K., Gao, Z. G., Van Rompaey, P., Gross, A. S., Chen, A., Van Calenbergh, S. *et al.* (2003). Modeling the adenosine receptors: Comparison of the binding domains of A2A agonists and antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, 46(23), 4847-4859.
- Kim, S. K., Li, Y., Park, C., Abrol, R. et Goddard, W. A.,3rd (2010). Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations. *ChemMedChem*, 5(9), 1594-1608.

- Kim, T. H., Chung, K. Y., Manglik, A., Hansen, A. L., Dror, R. O., Mildorf, T. J. *et al.* (2013). The role of ligands on the equilibria between functional states of a G protein-coupled receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 135(25), 9465-9474.
- Kinney, W. A., Almond Jr, H. R., Qi, J., Smith, C. E., Santulli, R. J., de Garavilla, L. *et al.* (2002). Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angewandte Chemie (International ed.in English)*, 41(16), 2940-2944.
- Kobilka, B., Gether, U., Seifert, R., Lin, S. et Ghanouni, P. (1999). Characterization of ligand-induced conformational states in the beta 2 adrenergic receptor. *Journal of receptor and signal transduction research*, 19(1-4), 293-300.
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(4), 794-807.
- Kobilka, B. K. et Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 28(8), 397-406.
- Kofuku, Y., Ueda, T., Okude, J., Shiraishi, Y., Kondo, K., Maeda, M. *et al.* (2012). Efficacy of the beta(2)-adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Nature communications*, 31045.
- Kolakowski, L. F., Jr (1994). GCRDb: A G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels*, 2(1), 1-7.
- Koshland, D. E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 98-104.
- Krebs, A., Villa, C., Edwards, P. C. et Schertler, G. F. (1998). Characterisation of an improved two-dimensional p22121 crystal from bovine rhodopsin. *Journal of Molecular Biology*, 282(5), 991-1003.
- Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E. *et al.* (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552-556.
- Kruse, A. C., Kobilka, B. K., Gautam, D., Sexton, P. M., Christopoulos, A. et Wess, J. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(7), 549-560.
- Kruse, A. C., Ring, A. M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K. *et al.* (2013). Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 504(7478), 101-106.

- Labarrere, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M. C. *et al.* (2003). Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 18(2), 77-88.
- Lameh, J., Philip, M., Sharma, Y. K., Moro, O., Ramachandran, J. et Sadee, W. (1992). Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop. *The Journal of biological chemistry*, 267(19), 13406-13412.
- Lane, J. R., Sexton, P. M. et Christopoulos, A. (2013). Bridging the gap: Bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 34(1), 59-66.
- Langham, R. G. et Kelly, D. J. (2013). Urotensin II and the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 22(1), 107-112.
- Langley, J. N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of physiology*, 33(4-5), 374-413.
- Lappano, R. et Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: Novel targets for drug discovery in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(1), 47-60.
- Lebon, G., Langmead, C. J., Tehan, B. G. et Hulme, E. C. (2009). Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, 75(2), 331-341.
- Lebon, G. et Tate, C. G. (2012). G protein-coupled receptors in the spotlight. *Medicine sciences : M/S*, 28(10), 876-882.
- Lefkowitz, R. J. et Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), 512-517.
- Leprince, J., Chatenet, D., Dubessy, C., Fournier, A., Pfeiffer, B., Scalbert, E. *et al.* (2008). Structure-activity relationships of urotensin II and URP. *Peptides*, 29(5), 658-673.
- Li, B., Scarselli, M., Knudsen, C. D., Kim, S. K., Jacobson, K. A., McMillin, S. M. *et al.* (2007). Rapid identification of functionally critical amino acids in a G protein-coupled receptor. *Nature methods*, 4(2), 169-174.
- Liapakis, G., Ballesteros, J. A., Papachristou, S., Chan, W. C., Chen, X. et Javitch, J. A. (2000). The forgotten serine. A critical role for ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(48), 37779-37788.
- Lin, S. W. et Sakmar, T. P. (1996). Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry*, 35(34), 11149-11159.

- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Abe, I. et Iida, M. (2003). Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *Journal of hypertension*, 21(1), 159-165.
- Lin, Y., Tsuchihashi, T., Matsumura, K., Fukuhara, M., Ohya, Y., Fujii, K. *et al.* (2003). Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 26(10), 839-845.
- Liu, Q., Pong, S. S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A. D., Williams, D. L., Jr *et al.* (1999). Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochemical and biophysical research communications*, 266(1), 174-178.
- Luttrell, L. M. et Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, 115(Pt 3), 455-465.
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rumenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M. *et al.* (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *The Journal of biological chemistry*, 280(12), 11134-11139.
- MacLean, M. R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H. *et al.* (2000). Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: Effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *British journal of pharmacology*, 130(2), 201-204.
- Maehle, A. H., Prull, C. R. et Halliwell, R. F. (2002). The emergence of the drug receptor theory. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(8), 637-641.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E. et Davenport, A. P. (2000). Orphan-receptor ligand human urotensin II: Receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *British journal of pharmacology*, 131(3), 441-446.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., Kleinz, M. J. et Davenport, A. P. (2008). Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: Relevance to function. *Peptides*, 29(5), 735-742.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., Wiley, K. E., Kleinz, M. J. et Davenport, A. P. (2004). Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides*, 25(10), 1767-1774.
- Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K. *et al.* (2012). Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), 321-326.

- Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H. H., Saldivia, V. R., Cheng, R. *et al.* (1995). Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics*, 29(2), 335-344.
- Marinissen, M. J. et Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*, 22(7), 368-376.
- Matsushita, M., Shichiri, M., Imai, T., Iwashina, M., Tanaka, H., Takasu, N. *et al.* (2001). Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *Journal of hypertension*, 19(12), 2185-2190.
- Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C. *et al.* (1999). Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochemical and biophysical research communications*, 265(1), 123-129.
- Moukhametzianov, R., Warne, T., Edwards, P. C., Serrano-Vega, M. J., Leslie, A. G., Tate, C. G. *et al.* (2011). Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a beta1-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8228-8232.
- Nathans, J. et Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, 34(3), 807-814.
- Noda, K., Saad, Y., Graham, R. M. et Karnik, S. S. (1994). The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines. *The Journal of biological chemistry*, 269(9), 6743-6752.
- Nothacker, H. P., Wang, Z., McNeill, A. M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B. *et al.* (1999). Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nature cell biology*, 1(6), 383-385.
- Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. et Schwartz, T. W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in pharmacological sciences*, 30(5), 249-259.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R. O., Mildorf, T. J., Arlow, D. H., Manglik, A. *et al.* (2013). The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation. *Cell*, 152(3), 532-542.
- O'Brien, J. A., Lemaire, W., Chen, T. B., Chang, R. S., Jacobson, M. A., Ha, S. N. *et al.* (2003). A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Molecular pharmacology*, 64(3), 731-740.
- Oldham, W. M. et Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews.Molecular cell biology*, 9(1), 60-71.

- Onan, D., Hannan, R. D. et Thomas, W. G. (2004). Urotensin II: The old kid in town. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 15(4), 175-182.
- Ong, K. L., Lam, K. S. et Cheung, B. M. (2005). Urotensin II: Its function in health and its role in disease. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 19(1), 65-75.
- Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N. G. et Bogachuk, A. S. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS letters*, 230(1-2), 1-5.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B. et Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery*, 5(12), 993-996.
- Page, C. P., Curtis, M. J., Sutter, M. C., Walker, M. J. et Hoffman, B. B. (1999). *Pharmacologie intégrée* (Trad. par G. Cheymol) (1^e éd. 1999), 6-8.
- Palczewski, K. (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annual Review of Biochemistry*, 75743-767.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A. *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 739-745.
- Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W. et Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, 454(7201), 183-187.
- Park, S. H., Das, B. B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H. J., Chu, M. *et al.* (2012). Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers. *Nature*, 491(7426), 779-783.
- Parthier, C., Reedtz-Runge, S., Rudolph, R. et Stubbs, M. T. (2009). Passing the baton in class B GPCRs: Peptide hormone activation via helix induction? *Trends in biochemical sciences*, 34(6), 303-310.
- Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, I. I., Barkley, M., Nishioka, R. S. *et al.* (1980). Urotensin II: A somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(8), 5021-5024.
- Pin, J. P., Galvez, T. et Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 98(3), 325-354.

- Pin, J. P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A. S., Liu, J., Galvez, T. *et al.* (2004). The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 96(5), 335-342.
- Povsic, T. J., Kohout, T. A. et Lefkowitz, R. J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 278(51), 51334-51339.
- Proulx, C. D., Holleran, B. J., Boucard, A. A., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. (2008). Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Molecular pharmacology*, 74(3), 552-561.
- Proulx, C. D., Holleran, B. J., Lavigne, P., Escher, E., Guillemette, G. et Leduc, R. (2008). Biological properties and functional determinants of the urotensin II receptor. *Peptides*, 29(5), 691-699.
- Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T. *et al.* (2006). Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16284-16289.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S. *et al.* (2011a). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549-555.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S. *et al.* (2011b). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), 175-180.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C. *et al.* (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387.
- Rasmussen, S. G., Jensen, A. D., Liapakis, G., Ghanouni, P., Javitch, J. A. et Gether, U. (1999). Mutation of a highly conserved aspartic acid in the beta2 adrenergic receptor: Constitutive activation, structural instability, and conformational rearrangement of transmembrane segment 6. *Molecular pharmacology*, 56(1), 175-184.
- Redka, D. S., Pisterzi, L. F. et Wells, J. W. (2008). Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. *Molecular pharmacology*, 74(3), 834-843.
- Revankar, C. M., Vines, C. M., Cimino, D. F. et Prossnitz, E. R. (2004). Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 279(23), 24578-24584.

- Ring, A. M., Manglik, A., Kruse, A. C., Enos, M. D., Weis, W. I., Garcia, K. C. *et al.* (2013). Adrenaline-activated structure of beta2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody. *Nature*, 502(7472), 575-579.
- Romano, C., Yang, W. L. et O'Malley, K. L. (1996). Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *The Journal of biological chemistry*, 271(45), 28612-28616.
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S. *et al.* (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5854), 1266-1273.
- Rosenbaum, D. M., Zhang, C., Lyons, J. A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D. H. *et al.* (2011). Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature*, 469(7329), 236-240.
- Ross, B., McKendy, K. et Giaid, A. (2010). Role of urotensin II in health and disease. *American journal of physiology.Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(5), R1156-72.
- Rovati, G. E., Capra, V. et Neubig, R. R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: Beyond the ground state. *Molecular pharmacology*, 71(4), 959-964.
- Sainsily, X., Cabana, J., Boulais, P. E., Holleran, B. J., Escher, E., Lavigne, P. *et al.* (2013). Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochemical pharmacology*, 86(11), 1584-1593.
- Sainsily, X., Cabana, J., Holleran, B. J., Escher, E., Lavigne, P. et Leduc, R. (2014). Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochemical pharmacology*, 92(2), 280-288.
- Sansuk, K., Deupi, X., Torrecillas, I. R., Jongejan, A., Nijmeijer, S., Bakker, R. A. *et al.* (2011). A structural insight into the reorientation of transmembrane domains 3 and 5 during family A G protein-coupled receptor activation. *Molecular pharmacology*, 79(2), 262-269.
- Sauzeau, V., Le Mellionec, E., Bertoglio, J., Scalbert, E., Pacaud, P. et Loirand, G. (2001). Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and rho-kinase. *Circulation research*, 88(11), 1102-1104.
- Schadel, S. A., Heck, M., Maretzki, D., Filipek, S., Teller, D. C., Palczewski, K. *et al.* (2003). Ligand channeling within a G-protein-coupled receptor. the entry and exit of retinals in native opsin. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 24896-24903.

- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauss, N., Choe, H. W. *et al.* (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455(7212), 497-502.
- Schioth, H. B. et Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology*, 142(1-2), 94-101.
- Schwartz, T. W., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. et Elling, C. E. (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46481-519.
- Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R. et Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The International journal of biochemistry and cell biology*, 40(6-7), 1111-1125.
- Segain, J. P., Rolli-Derkinderen, M., Gervois, N., Raingeard de la Bletiere, D., Loirand, G. et Pacaud, P. (2007). Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(2), 901-909.
- Shenouda, A., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H. et Giaid, A. (2002). Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50(7), 885-889.
- Shi, L., Liapakis, G., Xu, R., Guarneri, F., Ballesteros, J. A. et Javitch, J. A. (2002). Beta2 adrenergic receptor activation. modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *The Journal of biological chemistry*, 277(43), 40989-40996.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V. *et al.* (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, 475(7354), 65-70.
- Shoichet, B. K. et Kobilka, B. K. (2012). Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 33(5), 268-272.
- Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z. *et al.* (2013). Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*, 499(7459), 444-449.
- Smit, M. J., Vischer, H. F., Bakker, R. A., Jongejan, A., Timmerman, H., Pardo, L. *et al.* (2007). Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 4753-87.

- Standfuss, J., Edwards, P. C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D. D. *et al.* (2011). The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 471(7340), 656-660.
- Steitz, T. A., Goldman, A. et Engelman, D. M. (1982). Quantitative application of the helical hairpin hypothesis to membrane proteins. *Biophysical journal*, 37(1), 124-125.
- Stenkamp, R. E., Filipek, S., Driessen, C. A., Teller, D. C. et Palczewski, K. (2002). Crystal structure of rhodopsin: A template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta*, 1565(2), 168-182.
- Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Berry, C., Kirk, A. *et al.* (2001). Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(2), H925-8.
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Dixon, R. A. et Sigal, I. S. (1989). A single amino acid substitution in the beta-adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists. *The Journal of biological chemistry*, 264(28), 16470-16477.
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S. et Dixon, R. A. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*, 264(23), 13572-13578.
- Strader, C. D., Sigal, I. S. et Dixon, R. A. (1989). Structural basis of beta-adrenergic receptor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3(7), 1825-1832.
- Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y. *et al.* (2003). Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 310(3), 860-868.
- Suguro, T., Watanabe, T., Ban, Y., Kodate, S., Misaki, A., Hirano, T. *et al.* (2007). Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *American journal of hypertension*, 20(2), 211-217.
- Suryanarayana, S., Daunt, D. A., Von Zastrow, M. et Kobilka, B. K. (1991). A point mutation in the seventh hydrophobic domain of the alpha 2 adrenergic receptor increases its affinity for a family of beta receptor antagonists. *The Journal of biological chemistry*, 266(23), 15488-15492.
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G. W., Kufareva, I. *et al.* (2013). Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6152), 1387-1390.

- Tang, X. L., Wang, Y., Li, D. L., Luo, J. et Liu, M. Y. (2012). Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): Biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(3), 363-371.
- Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E. *et al.* (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, 485(7398), 395-399.
- Tian, S., Choi, W. T., Liu, D., Pesavento, J., Wang, Y., An, J. *et al.* (2005). Distinct functional sites for human immunodeficiency virus type 1 and stromal cell-derived factor 1alpha on CXCR4 transmembrane helical domains. *Journal of virology*, 79(20), 12667-12673.
- Tobin, A. B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1S167-76.
- Tostivint, H., Joly, L., Lihmann, I., Parmentier, C., Lebon, A., Morisson, M. *et al.* (2006). Comparative genomics provides evidence for close evolutionary relationships between the urotensin II and somatostatin gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2237-2242.
- Tota, M. R. et Strader, C. D. (1990). Characterization of the binding domain of the beta-adrenergic receptor with the fluorescent antagonist carazolol. evidence for a buried ligand binding site. *The Journal of biological chemistry*, 265(28), 16891-16897.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Ito, S. et Murakami, O. (2003). Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clinical science (London, England : 1979)*, 104(1), 1-5.
- Totsune, K., Takahashi, K., Arihara, Z., Sone, M., Satoh, F., Ito, S. *et al.* (2001). Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet*, 358(9284), 810-811.
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A. et Filipek, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry*, 19(8), 1090-1109.
- Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M. et Schertler, G. F. (1997). Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature*, 389(6647), 203-206.
- Urizar, E., Claeyens, S., Deupi, X., Govaerts, C., Costagliola, S., Vassart, G. *et al.* (2005). An activation switch in the rhodopsin family of G protein-coupled receptors: The thyrotropin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 280(17), 17135-17141.
- Vaudry, H., Do Rego, J. C., Le Mevel, J. C., Chatenet, D., Tostivint, H., Fournier, A. *et al.* (2010). Urotensin II, from fish to human. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 120053-66.

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Vardy, E. *et al.* (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6132), 615-619.
- Wang, C., Jiang, Y., Ma, J., Wu, H., Wacker, D., Katritch, V. *et al.* (2013a). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6132), 610-614.
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W. *et al.* (2013b). Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature*, 497(7449), 338-343.
- Wang, D., Tan, Y. C., Kreitzer, G. E., Nakai, Y., Shan, D., Zheng, Y. *et al.* (2006). G proteins G12 and G13 control the dynamic turnover of growth factor-induced dorsal ruffles. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), 32660-32667.
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R. *et al.* (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 454(7203), 486-491.
- Watson, A. M., Lambert, G. W., Smith, K. J. et May, C. N. (2003). Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension*, 42(3), 373-379.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M. *et al.* (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10782-10787.
- Wess, J. (1993). Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: Structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. *Life Sciences*, 53(19), 1447-1463.
- Wheatley, M., Wootten, D., Conner, M. T., Simms, J., Kendrick, R., Logan, R. T. *et al.* (2012). Lifting the lid on GPCRs: The role of extracellular loops. *British journal of pharmacology*, 165(6), 1688-1703.
- Wieland, K., Zuurmond, H. M., Krasel, C., Ijzerman, A. P. et Lohse, M. J. (1996). Involvement of asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9276-9281.
- Wootten, D., Christopoulos, A. et Sexton, P. M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery: Implications for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(8), 630-644.

- Wooten, D., Simms, J., Miller, L. J., Christopoulos, A. et Sexton, P. M. (2013). Polar transmembrane interactions drive formation of ligand-specific and signal pathway-biased family B G protein-coupled receptor conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13), 5211-5216.
- Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V. *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6007), 1066-1071.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E. *et al.* (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTC. *Nature*, 485(7398), 327-332.
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y. *et al.* (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6179), 58-64.
- Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G. *et al.* (2011). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6027), 322-327.
- Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F. *et al.* (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), 12328-12338.
- You, Z., Genest, J., Jr, Barrette, P. O., Hafiane, A., Behm, D. J., D'Orleans-Juste, P. *et al.* (2012). Genetic and pharmacological manipulation of urotensin II ameliorate the metabolic and atherosclerosis sequelae in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1809-1816.
- Zhang, A. Y., Chen, Y. F., Zhang, D. X., Yi, F. X., Qi, J., Andrade-Gordon, P. *et al.* (2003). Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*, 285(4), F792-8.
- Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y. *et al.* (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, 492(7429), 387-392.
- Zhang, K., Zhang, J., Gao, Z. G., Zhang, D., Zhu, L., Han, G. W. *et al.* (2014). Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*, 509(7498), 115-118.
- Zhang, Y., Rodriguez, A. L. et Conn, P. J. (2005). Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315(3), 1212-1219.

- Zhou, H. X. (2010). From induced fit to conformational selection: A continuum of binding mechanism controlled by the timescale of conformational transitions. *Biophysical journal*, 98(6), L15-7.
- Ziltener, P., Mueller, C., Haenig, B., Scherz, M. W. et Nayler, O. (2002). Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *Journal of receptor and signal transduction research*, 22(1-4), 155-168.

ANNEXES

Liste des publications

Brulé, C., Perzo, N, Joubert, J.E., **Sainsily, X.**, Leduc, R., Castel, H., and Prézeau, L., Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin-II receptor to modulate its cellular behaviors, *FASEBJ*, 2014; 28 (12), 5148-5162.

Sainsily, X., Cabana J., Holleran B.J., Escher, E., Lavigne, P. and Leduc R., Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the Urotensin II receptor, *Biochemical Pharmacology* 2014; 92(2), 280-288.

Sainsily, X., Cabana J., Boulais, P.E., Holleran B.J., Escher, E., Lavigne, P. and Leduc R., Identification of transmembrane domain 3, 4 & 5 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the Urotensin II receptor, *Biochemical Pharmacology* 2013; 86(11), 1584-1593