

## Modèles tridimensionnels des récepteurs couplés aux protéines G

Marcel F. Hibert  
Jan Hoflack  
Susanne  
Trumpp-Kallmeyer  
Anne Bruinvels

Plus de 60 récepteurs différents appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont été clonés et séquencés. S'appuyant sur les données de la séquence en acides aminés et quelques résultats expérimentaux, un modèle tridimensionnel des domaines transmembranaires a été proposé en prenant pour référence la structure d'une protéine transmembranaire n'appartenant pas à la famille des RCPG : la bactériorhodopsine. Ce modèle a permis de proposer un mécanisme liant l'activation aux changements conformationnels du récepteur et d'envisager une rationalisation de la conception de nouveaux ligands, agonistes ou antagonistes.

**D**es générations de biologistes et de pharmacochimistes se sont intéressés au processus de reconnaissance hormone-récepteur notamment pour développer de nouveaux produits à activité thérapeutique. Bien que le concept de l'interaction hormone-récepteur se soit imposé au début de ce siècle, il est frappant de constater que notre représentation du récepteur lui-même est restée relativement abstraite jusqu'à ces dernières années puisque l'accès à sa structure chimique était impossible.

Les progrès récents de la pharmacologie moléculaire et de la biologie moléculaire ont enfin permis d'accéder à la structure primaire de récepteurs membranaires de première importance : les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La résolution par cryomicroscopie électronique d'une protéine membranaire à sept hélices, la bactériorhodopsine (Henderson *et al.* [1]) et la modélisation moléculaire permettent de proposer

aujourd'hui à la communauté scientifique, une représentation structurale tridimensionnelle [2, 3].

### Les récepteurs couplés aux protéines G

Parmi les différentes classes de récepteurs membranaires dont la fonction est de convertir sélectivement un signal extracellulaire en une cascade d'événements intracellulaires, il en existe une pour laquelle les différents protagonistes du phénomène de transduction ont été identifiés. Ce processus correspond à une chaîne d'interactions moléculaires entre médiateur, récepteur, protéine G et effecteur (*figure 1*). Le médiateur extracellulaire est une molécule (parfois combinée à un *stimulus* physico-chimique tel qu'un photon) qui se fixe sur son récepteur spécifique. Cette fixation induit un changement conformationnel du récepteur qui passe alors à l'état activé. Il peut ainsi s'associer à une protéine intracellulaire, la protéine G, constituée de trois sous-

#### ADRESSE

M.F. Hibert : *chef de département*. J. Hoflack : *senior scientist*. S. Trumpp-Kallmeyer : *senior scientist*. A. Bruinvels : *stagiaire*. Marion Merrell Dow Research Institute, 16, rue d'Ankara, 67009 Strasbourg Cedex, France.

## RÉFÉRENCES

- Henderson RJ, Baldwin J, Ceska TH, Zemlin F, Beckman L, Downing K. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution cryomicroscopy. *J Mol Biol* 1990 ; 213 : 899-929.
- Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, Hoflack J. Three-dimensional models of neurotransmitter G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 1991 ; 40 : 8-15.
- Trumpp-Kallmeyer S, Hoflack J, Bruinvels A, Hibert M. Modelling of G protein-coupled receptors. Application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine and mammalian opsin receptors. *J Med Chem* 1992 ; 35 : 3448-62.
- Collins S, Caron M, Lefkowitz R. From ligand binding to gene expression : new insights into regulation of G protein-coupled receptors. *Trends Biol Sci* 1992 ; 1 : 37-9.
- Probst W, Snyder L, Schuster D, Brosius J, Sealfon S. Sequence alignment of the G protein-coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992 ; 11 : 1-20.
- Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino-acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 1970 ; 48 : 443-53.
- Deisenberg J, Miki K, Huber R, Michel H. The structure of the photosynthetic reaction center. *Nature* 1985 ; 884 : 618-22.
- Von Heijne G. Proline kinks in transmembrane  $\alpha$ -helices. *J Mol Biol* 1991 ; 218 : 499-503.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic receptor genes. *Science* 1987 ; 237 : 529-32.
- Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptor, model for the study of receptor coupled to guanine nucleotides regulatory proteins. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 4993-6.
- Dohlman HG, Bouvier M, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 14282-8.
- Dixon RAF, Strader CD, Sigal IS. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rep Med Chem* 1988 ; 23 : 221-33.
- Fraser CM, Wang CD, Robinson DA, Gocayne JD, Venter JC. Site-directed mutagenesis of  $m_1$  muscarinic acetylcholine receptors : conserved aspartic acids play important roles in receptor functions. *Mol Pharmacol* 1988 ; 36 : 840-7.

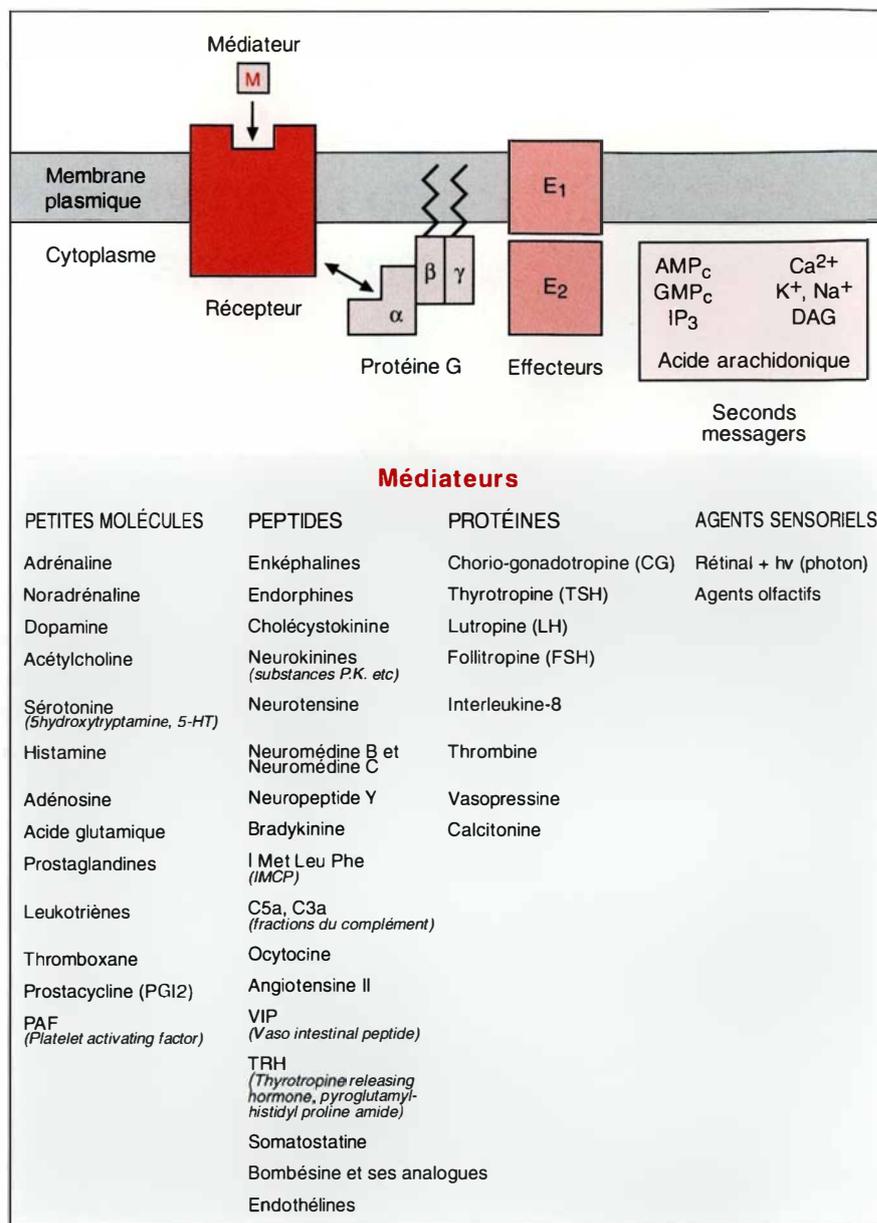


Figure 1. **Représentation schématique du système médiateur-récepteur-protéine G-effacteur et quelques exemples de médiateurs.**

unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et entraîner la dissociation de cette dernière en deux entités : l'ensemble  $\beta$ - $\gamma$  et la sous-unité  $\alpha$ , qui peut alors activer un effecteur intracellulaire (enzyme, canal ionique) engendrant ainsi des messagers secondaires.

Globalement, un signal extracellulaire aura été sélectivement transmis par le récepteur, amplifié au cours des diverses étapes du processus et enfin traduit en une réponse cellulaire.

Il existe bien sûr une série de mécanismes de contrôle et de régulation de

ce processus, notamment par phosphorylation du récepteur et internalisation après complexation par des protéines régulatrices, ou par régulation de l'expression [4].

Malgré les progrès réalisés, le mécanisme précis d'activation du récepteur sous l'action d'une molécule extracellulaire reste à déterminer. Le clonage et l'expression des gènes codant pour ces récepteurs permettent maintenant d'explorer expérimentalement les relations entre structure et activité et de proposer des modèles bidimensionnels

et tridimensionnels du complexe moléculaire hormone-récepteur.

## Structure des récepteurs couplés aux protéines G

Environ une soixantaine de RCPG ont actuellement été clonés et séquencés [5]. Il apparaît que tous ces récepteurs présentent des homologies au niveau non seulement de leurs séquences peptidiques mais aussi de leur ADN. Ils définissent ainsi une seule famille génétique et dérivent probablement d'ancêtres communs.

Il est intéressant de constater que la nature a utilisé le même type d'architecture moléculaire pour, à la fois, interagir avec diverses protéines G intracellulaires, et répondre à des systèmes d'activation extracellulaires aussi variés que des petits neurotransmetteurs cationiques (adrénaline, acétylcholine, etc.), des neuropeptides (neurokinines, endothéline, etc.), des protéines (interleukine 8, gonadotrophotropine, etc.) ou des molécules liées au récepteur de manière covalente et activée par la lumière (*cis*-rétinal) (figure 1). Puisque ces récepteurs correspondent à une série de

variations sur un même thème structural, l'analyse des séquences primaires disponibles combinée à l'exploitation de résultats expérimentaux devraient permettre de définir un modèle structural tridimensionnel générique, extrapolable à tous les membres de la famille des RCPG. Il devrait en résulter une meilleure compréhension de la nature du complexe hormone-récepteur et des mécanismes moléculaires responsables de la transduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

### Structure primaire et secondaire des récepteurs couplés aux protéines G

Tous les membres de la « superfamille » des RCPG présentent des analogies structurales et fonctionnelles que l'on peut tenter d'appréhender grâce à une analyse détaillée de leur composition en acides aminés.

• *Alignement des séquences primaires.* Des méthodes analytiques permettent la comparaison de séquences peptidiques [5, 6]. Appliquées aux RCPG, elles ont permis un alignement peu ambigu des séquences pour certains domaines où il existe des résidus conservés (figure 2). L'homologie (identité

ou similarité) entre récepteurs peut être quantifiée et varie de 6 à 93 %.

• *Analyse de l'hydrophobicité.* Des méthodes affectant un coefficient d'hydrophobicité (hydrophobie ou hydrophilie) aux différents acides aminés permettent d'analyser une séquence primaire et de postuler, pour une protéine donnée, quels seront les domaines compatibles avec un environnement aqueux (polaire) ou hydrophobe (apolaire). Dans le cas des RCPG, une analyse globale des profils d'hydrophobicité suggère que tous ces récepteurs possèdent sept segments d'une vingtaine d'acides aminés majoritairement hydrophobes, formant probablement des régions transmembranaires.

• *Prédiction de la structure secondaire.* L'analyse de la composition en acides aminés des sept régions transmembranaires suggère que chacune se structure selon une hélice  $\alpha$ . De manière inusuelle, des résidus glycine ou proline sont localisés au sein de ces hélices. Il faut cependant noter que cette caractéristique se retrouve dans un certain nombre d'autres structures expérimentales de protéines membranaires [1, 7]. Ces résidus

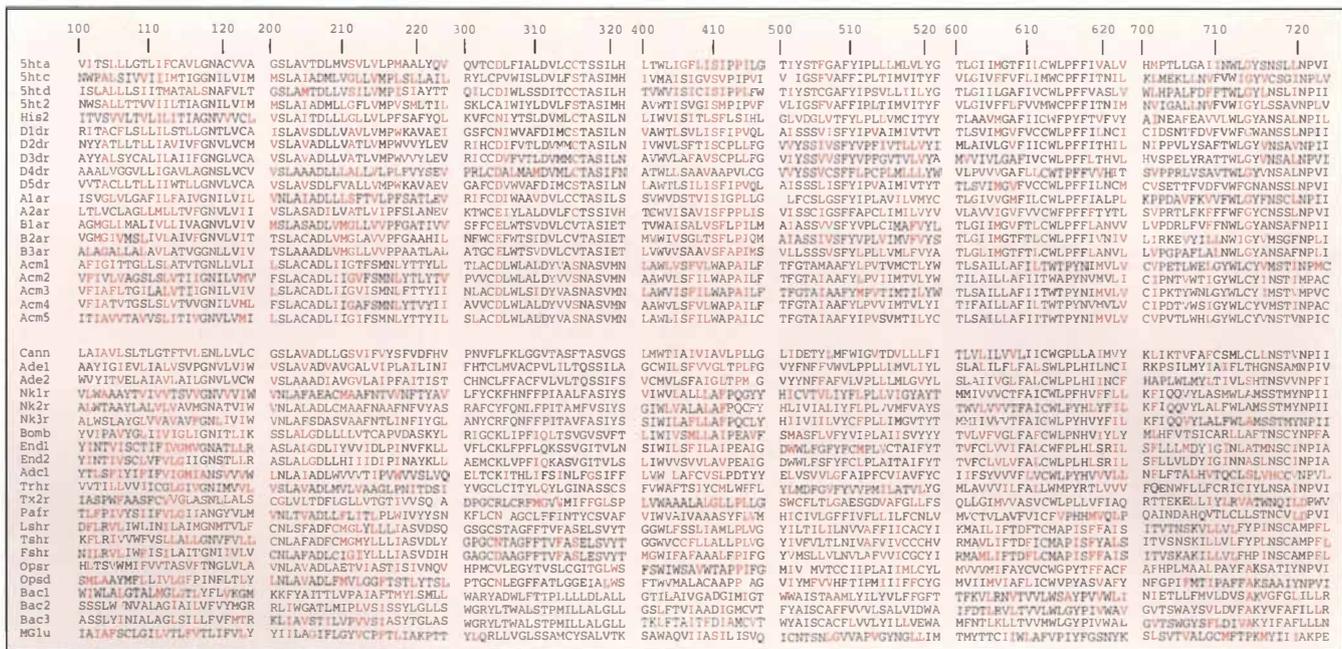


Figure 2. Alignement des séquences primaires de 42 récepteurs couplés aux protéines G. Seuls les domaines transmembranaires ou un fragment de ces domaines sont représentés et sont numérotés 101, 102, etc., pour le premier domaine ; 201, 202, etc., pour le deuxième ; etc. Les résidus marqués en gras sont identiques et hautement conservés. Les résidus représentés en rouge sont similaires et conservés.

## RÉFÉRENCES

14. Strader CD, Sigal IS, Candelore MR, Rands E, Hill WS, Dixon RAF. Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the  $\beta$ -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 10267-71.
15. Horstman DA, Brandon S, Wilson A, Guyer C, Cragoe E Jr, Limbird L. An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of  $\alpha$ -adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 21590-5.
16. Strader CD, Candelore MR, Hill WS, Sigal IS, Dixon RAF. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 13572-8.
17. Marullo S, Emorine L, Strosberg D, Delavier-Klutcho C. Selective binding of ligands to  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  or chimeric  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors involve multiple subsites. *EMBO J* 1990 ; 9 : 1471-6.
18. Dixon RAF, Sigal I, Candelore M, et al. Structural features required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *EMBO J* 1987 ; 6 : 3269-75.
19. Dahl SG, Edwarsen O, Sylte I. Molecular dynamics of dopamine at the  $D_2$  receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8111-5.
20. Maloney-Huss K, Lybrand TP. Three-dimensional structure for the  $\beta_2$  adrenergic receptor protein based on computer modelling studies. *J Mol Biol* 1992 ; 225 : 859-71.
21. Venter JC, Fraser C, Kerlavage A, Buck M. Molecular biology of adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. *Biochem Pharmacol* 1989 ; 38 : 1197-208.
22. Findlay J, Eliopoulos E. Three-dimensional modelling of G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990 ; 11 : 492-9.
23. Pardo L, Ballesteros JA, Osman R, Weinstein H. On the use of the transmembrane domain of bacteriorhodopsin as a template for modelling the three-dimensional structure of guanine nucleotide-binding regulatory protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4009-12.
24. Sussman JL, Harl M, Frolau F, et al. Atomic structure of acetylcholine esterase from *Torpedo californica* : a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991 ; 253 : 872-9.
25. Dougherty DA, Stauffer D. Acetylcholine binding by a synthetic receptor. Implications for biological recognition. *Science* 1990 ; 250 : 1558-60.
- contribuent vraisemblablement à la dynamique interne du récepteur [8].
- *Analyse des acides aminés conservés.* Généralement, le segment N-terminal porte des sites de glycosylation (résidus asparagine) en nombre et localisation variable selon le sous-type de récepteur [9] alors que la partie C-terminale porte des sites de phosphorylation (sérine ou thréonine), de même que la troisième boucle cytoplasmique [10].
- La partie transmembranaire présente le plus haut degré de conservation (figure 2). On remarque que certains acides aminés sont conservés dans pratiquement tous les RCPG. Ce sont des résidus neutres (proline ou glycine), aromatiques (tryptophane sur les hélices 4 et 6) ou chargés (par exemple, l'aspartate de l'hélice 2). On peut émettre l'hypothèse que ces résidus jouent un rôle indispensable dans la structure ou la fonction commune à tous les RCPG. En revanche, l'aspartate sur l'hélice 3 n'est conservé que dans les récepteurs, activés par des neurotransmetteurs cationiques. On peut postuler que ces résidus ne sont impliqués que dans des fonctions spécifiques à ces sous-classes de RCPG.- *Données expérimentales.* Des études enzymatiques et immunologiques ont permis de localiser les parties N- et C-terminales ainsi que les boucles hydrophiles des récepteurs notamment du récepteur  $\beta$ -adrénergique [11]. Ainsi, la partie N-terminale du récepteur est probablement toujours extracellulaire alors que la partie C-terminale est intracellulaire. Des études de biologie moléculaire et notamment la construction de récepteurs chimériques ont montré que la partie transmembranaire est responsable de la liaison du médiateur extracellulaire alors que la troisième boucle intracellulaire, reliant les hélices 5 et 6, ainsi que la partie C-terminale sont responsables du couplage spécifique du récepteur à la protéine G [12], ces deux fonctions étant dissociables.

La construction de récepteurs chimériques, la mutagenèse dirigée, le marquage d'affinité et le dichroïsme circulaire ont permis d'identifier les domaines et certains résidus responsables de la fixation du ligand médiateur. Ainsi l'aspartate sur l'hélice 3 joue un rôle essentiel dans la fixation des neurotransmetteurs cationiques, alors que celui situé sur l'hélice 2 a un effet moins marqué [13, 14], probablement de nature allostérique sous l'effet des ions  $Na^+$  ou  $H^+$  intracellulaires [15]. Deux résidus sérine appartenant à l'hélice 5 sont impliqués dans la fixation des catécholamines [16]. Enfin, deux noyaux aromatiques modulent la fixation des neurotransmetteurs ou l'isomérisation du rétinol au sein des opsines. Ces résultats semblent indiquer que les hélices 2, 3, 5 et 6 contribuent aux processus de reconnaissance et d'activation. Cependant, la contribution d'autres domaines en fonction de la nature du ligand a été clairement établie [17].

Un modèle bidimensionnel dérivé de ces analyses est représenté sur la figure 3A [18]. Malgré la remarquable avancée que ce modèle représente, il ne donne pas accès au mode d'interaction hormone-récepteur ni au processus d'activation de ce récepteur. Le passage à un modèle tridimensionnel constitue un pas important vers la compréhension de ces mécanismes.

### Structure tridimensionnelle des RCPG

La purification et la cristallisation non dénaturante des RCPG restent, du fait de leur nature membranaire, un problème non résolu rendant impossible la détermination expérimentale de leur structure tridimensionnelle. Des techniques de modélisation n'utilisant pas de structure peptidique de référence [19, 20] ou s'appuyant sur des données expérimentales encore mal définies [21] ont fourni des modèles peu précis. Plus récemment, en utilisant comme référence la structure de la bactériorhodopsine déterminée par cryomicroscopie électronique [1], des modèles plus précis ont été proposés [2, 3, 22]. Quoique la résolution reste faible (0,3 à 0,35 nm), le squelette de cette protéine a pu être localisé pour la partie transmembranaire ; il correspond à sept hélices  $\alpha$  transmembranaires. Bien que cette protéine ne présente pas d'homologie de séquence avec les RCPG et qu'elle ne soit pas elle-même couplée aux protéines G, son mécanisme d'activation par

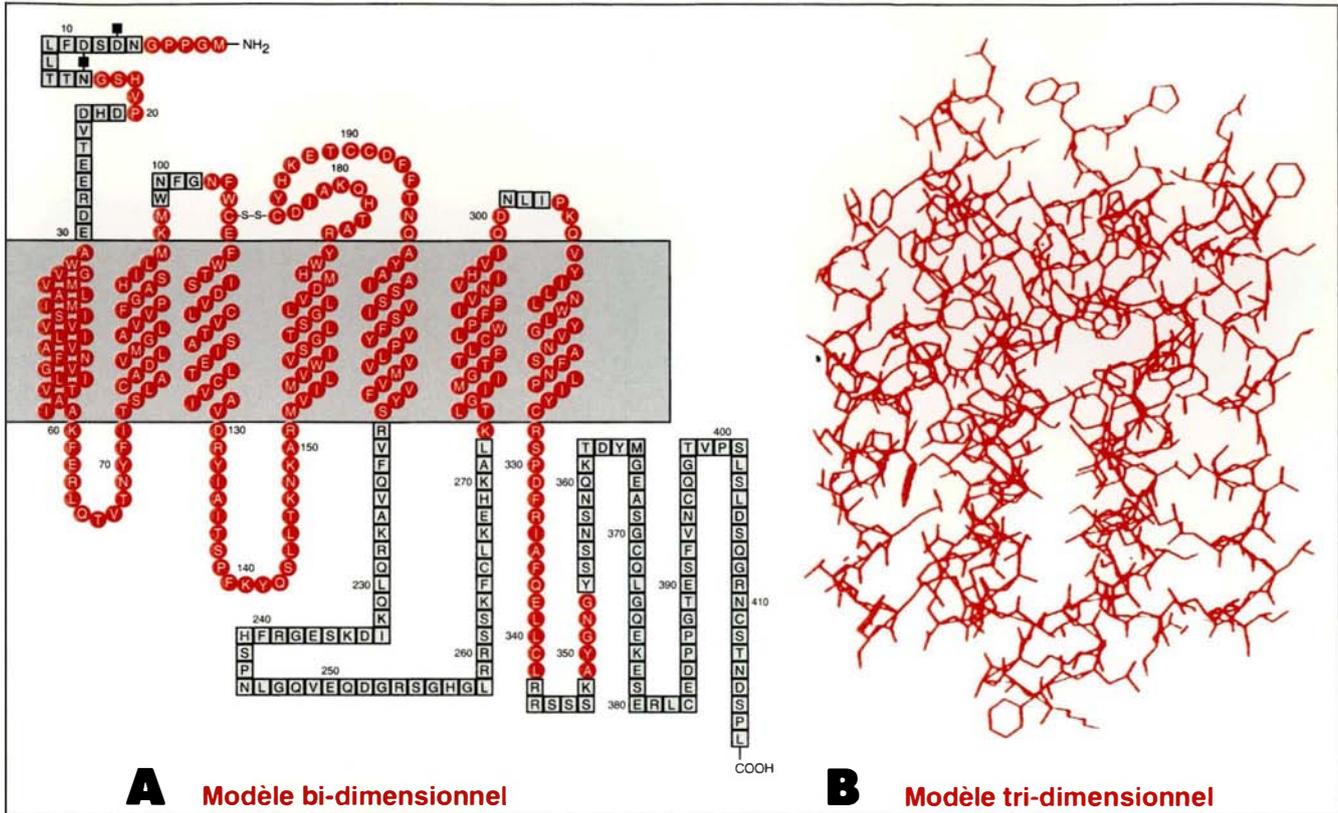


Figure 3. **A. Modèle bidimensionnel du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique de hamster** (reproduit d'après [18], avec l'autorisation de l'éditeur). Les résidus représentés par des carrés gris peuvent être supprimés sans que le récepteur perde sa capacité à fixer les ligands. Ils correspondent essentiellement aux boucles hydrophiles. La suppression de l'un quelconque des domaines transmembranaires conduit à une structure ne complexant plus les ligands. **B. Modèle tri-dimensionnel du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique**. Tous les atomes des sept domaines transmembranaires sont représentés, à l'exception des atomes d'hydrogène.

photo-isomérisation du rétinol et sa fonction de transfert de protons, sont similaires à ceux des opsines de mammifères qui, elles, appartiennent aux RCPG. Par ailleurs, les sept domaines transmembranaires peuvent être considérés comme un motif structural commun, bien que la correspondance de leur empiement ait été récemment remise en cause [23].

Les séquences primaires d'une vingtaine de RCPG ont ainsi été repliées dans l'espace, grâce à des programmes de modélisation moléculaire, en accolant les hélices de manière analogue à la bactériorhodopsine. Leur orientation a été définie par la prise en compte de tous les résultats expérimentaux disponibles. La géométrie des structures a finalement été optimisée en minimisant leur énergie interne [2, 3]. Les caractéristiques générales du domaine transmembranaire des RCPG seraient donc les suivantes (figure 3B et figure 4) : sept

hélices  $\alpha$  très étroitement accolées et définissant une fente centrale diédrique, étroite et profonde d'environ 20Å. Les résidus chargés et conservés sont localisés au cœur de la protéine. Au fond de cette fente, on peut observer une poche hydrophobe délimitée par les hélices 3, 4, 5 et 6, et contenant tous les résidus impliqués dans le processus de reconnaissance récepteur-médiateur : Asp<sub>311</sub> de l'hélice 3, Ser<sub>505</sub> et Ser<sub>508</sub> de l'hélice 5, etc. Il est postulé que cette région correspond au site de liaison des agonistes.

Cette topographie constitue en elle-même une première surprise dans la mesure où l'on pouvait imaginer jusqu'alors que le site de fixation du médiateur extracellulaire serait plutôt un site relativement bien accessible à la surface de la protéine réceptrice et de nature peu hydrophobe dans la mesure où ces médiateurs portent une charge positive (neurotransmetteurs

cationiques) ou sont de nature nettement hydrophile (adénosine, neuropeptides, etc.).

Ce mode d'interaction n'est cependant pas unique puisque, par exemple, la structure cristallographique de l'acétylcholinestérase, récemment publiée [24], indique que l'acétylcholine, très hydrophile et portant une charge positive, doit également parcourir un long canal hydrophobe pour atteindre le site catalytique de cette enzyme. Ces phénomènes ne pourront être modélisés et compris qu'en prenant en compte les interactions électrostatiques à moyenne et courte distance, les phénomènes de désolvatation et enfin la nature des interactions entre médiateur et récepteur en contact.

Pour l'instant, on a pu étudier le mode de complexation de cinq neurotransmetteurs au site actif de leurs récepteurs respectifs (figures 5 et 6) : la dopamine, la noradrénaline, l'adréna-

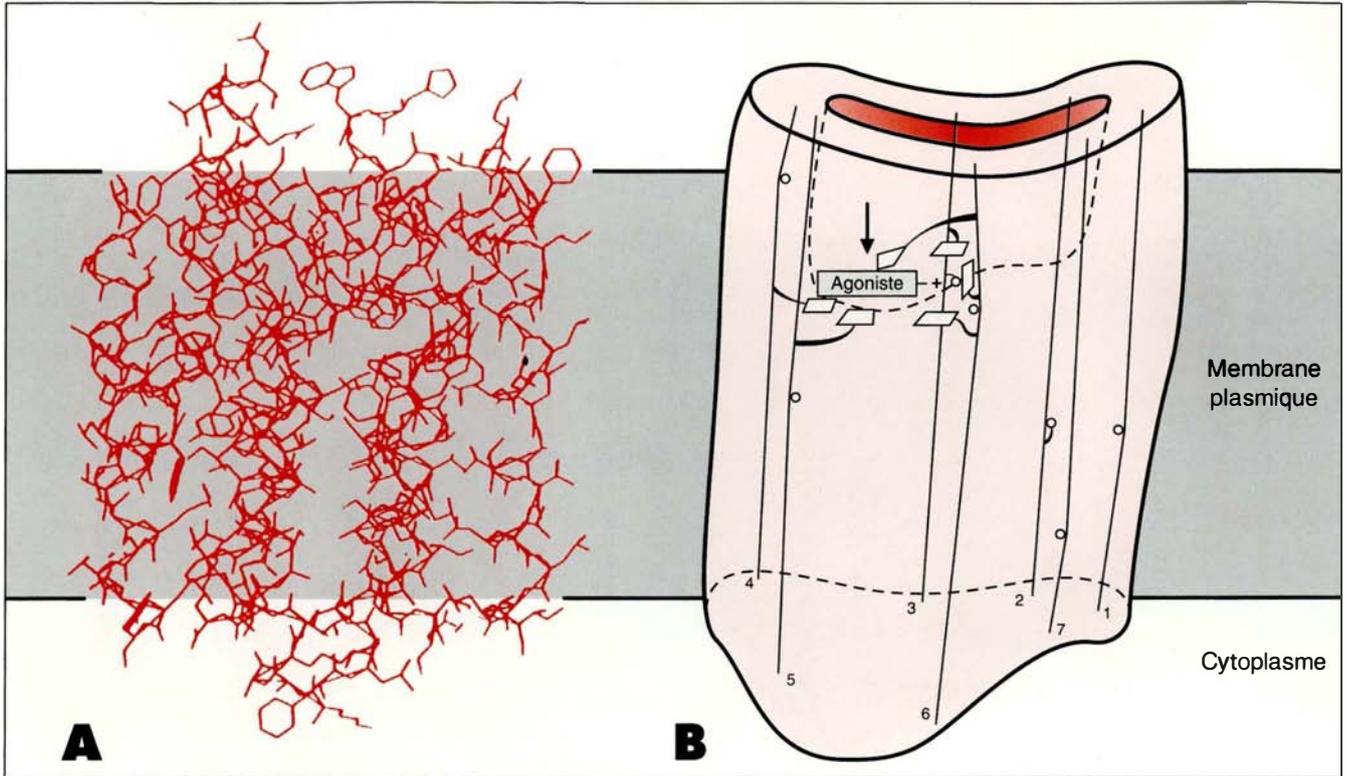


Figure 4. **Modèles en trois dimensions des récepteurs couplés aux protéines G interagissant avec des neurotransmetteurs cationiques.** **A.** Représentation atomique : tous les atomes du domaine transmembranaire du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique sont représentés en rouge, à l'exception des atomes d'hydrogène. **B.** Représentation schématique : les sept domaines transmembranaires sont des structures en hélice- $\alpha$  dont l'axe principal est représenté en noir. Elles sont numérotées de 1 à 7. Ces sept hélices- $\alpha$  transmembranaires définissent au sein de la protéine une cavité étroite, profonde d'environ 15 Å et s'ouvrant vers l'extérieur de la cellule (fente rouge). L'agoniste pénètre dans cette fente et interagit avec les chaînes latérales des acides aminés portés par les hélices 3, 4, 5 et 6 (en blanc) et induit ainsi un changement conformationnel du récepteur conduisant à son activation.

line, la sérotonine et l'acétylcholine, respectivement sur les récepteurs  $D_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_2$ , 5-HT<sub>2</sub> et  $m_2$ . Chaque fois, semble-t-il, une excellente complémentarité structurale a été observée entre le neurotransmetteur et son récepteur.

Les interactions sont les suivantes :

- Une paire d'ions entre l'ammonium du ligand et l'aspartate 311 du récepteur. Dans le cas des récepteurs  $\alpha_2$  et  $\beta_2$  adrénergiques et muscariniques, les résultats expérimentaux de mutagenèse dirigée et de marquage d'affinité irréversible montrent que le résidu Asp<sub>311</sub>, conservé dans tous les récepteurs de cette classe de médiateurs, est absolument nécessaire à la bonne complexation des ligands. Une paire intime d'ions a pu être formée au cœur des modèles de récepteur entre l'ammonium des ligands et cet aspartate localisé sur le troisième domaine transmembranaire à environ

1,5 nm de l'ouverture du domaine d'interaction.

- Trois résidus aromatiques conservés formant une cage hydrophobe et stabilisante autour de la paire d'ions. De manière a priori inattendue, on observe que trois résidus aromatiques hautement conservés dans la sous-classe des RCPG activés par des médiateurs cationiques peuvent effectivement « solvater » la paire d'ions ammonium-Asp<sub>311</sub>. Cette hypothèse a depuis été renforcée par la publication de systèmes expérimentaux analogues [24-27]. Le rôle de ce système serait triple : stabiliser la charge positive portée par le neurotransmetteur ; considérablement renforcer l'énergie d'interaction entre les deux entités ioniques par rapport à un milieu aqueux ; constituer le système déclenchant la réorganisation structurale du récepteur, l'amenant à sa conformation active, ainsi qu'il sera discuté plus loin.

- Des interactions spécifiques au récepteur et au ligand considéré. La tête cationique de chaque ligand a pu être positionnée dans le site de reconnaissance ainsi que l'on vient de le mentionner. La présence d'une poche adjacente à l'aspartate 311 et délimitée par les hélices 3, 4, 5 et 6 semble appropriée pour loger la partie restante du médiateur considéré. Une adéquation quasi parfaite entre la structure du médiateur et les résidus de cette poche a été observée dans ce modèle. Ainsi, dans tous les récepteurs de catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline), on trouve dans cette poche deux résidus sérine (Ser<sub>505</sub> et Ser<sub>508</sub>) conservés dans une position et une géométrie idéales pour interagir, par liaison hydrogène, avec les deux groupes hydroxyles du catéchol du médiateur. La sérotonine, en revanche, ne porte qu'un seul groupe hydroxyle : ses récepteurs ne présen-

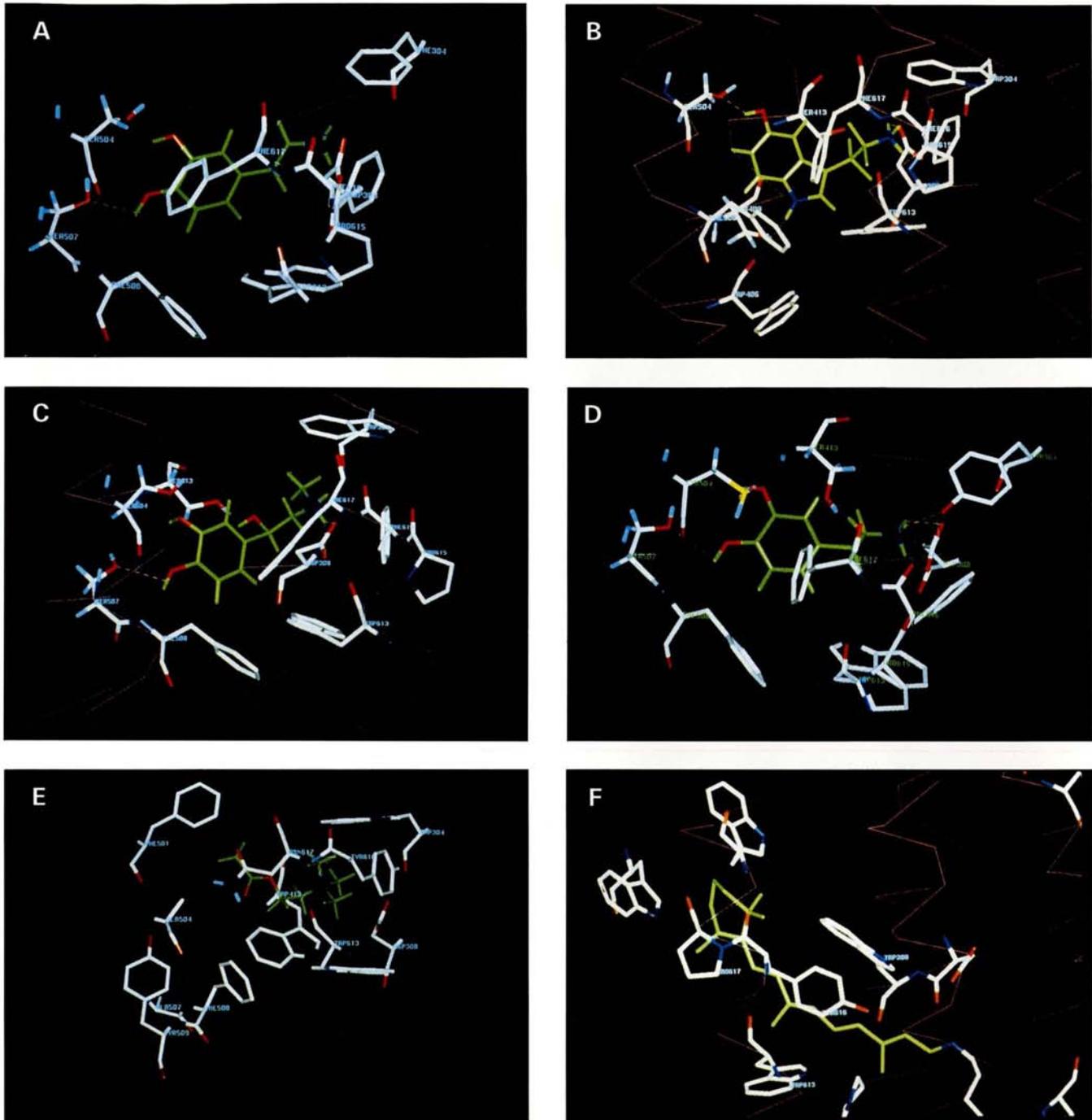


Figure 5. **Vues des médiateurs endogènes dans leur site de reconnaissance.** **A.** Dopamine dans le récepteur  $D_2$ . **B.** Sérotonine dans le récepteur  $5-HT_2$ . **C.** Adrénaline dans le récepteur  $\beta_2$ . **D.** Noradrénaline dans le récepteur  $\alpha_2$ . **E.** Acétylcholine dans le récepteur  $m_2$ . **F.** Rétinal dans la bactériorhodopsine. (D'après [1].) Le squelette carboné du médiateur est coloré en vert, celui des résidus du récepteur est en blanc. La trace de la chaîne peptidique est en rose.

tent plus qu'une seule des deux sérines (Ser<sub>505</sub>), l'autre étant remplacée par une alanine. Enfin, l'acétylcholine ne présente pas de groupe hydroxyle aromatique : aucun des cinq récepteurs muscariniques ne possède de sérine sur l'hélice 5.

De la même manière, tous les récepteurs interagissant avec un médiateur aromatique (dopamine, adrénaline, noradrénaline, sérotonine) possèdent, hautement conservée sur l'hélice 6, une phénylalanine (Phe<sub>617</sub>) qui est en position idéale pour former une interaction aromatique-aromatique avec le noyau aromatique du médiateur. En revanche, dans les récepteurs de l'acétylcholine, cette phénylalanine 617 est remplacée par un résidu asparagine (Asn<sub>617</sub>), ce qui est adéquat puisque l'acétylcholine possède non pas un noyau aromatique mais une fonction ester qui peut interagir par liaison hydrogène avec cette asparagine 617.

Enfin, l'atome d'azote du noyau indole de la sérotonine peut former une liaison hydrogène spécifique avec une sérine de l'hélice 4 (Ser<sub>406</sub>) et l'hydroxyle de la chaîne latérale de l'adrénaline et de la noradrénaline peut former une liaison stéréospécifique avec la sérine 410 de l'hélice 4 de leurs récepteurs respectifs.

Il peut exister, d'après ce modèle, une complémentarité parfaite entre un médiateur et son site de fixation au sein de son récepteur. Cette étude a été étendue à de nombreux autres récepteurs interagissant avec des médiateurs de nature différente (adénosine, cannabinoïdes, neuropeptides, etc.), et la complémentarité structurale médiateur-récepteur illustrée précédemment a toujours pu être observée. Il est, de ce point de vue, remarquable de constater que, bien que les sites de fixation des agonistes soient de nature différente du fait de subtiles variations des chaînes latérales des résidus les définissant, leur position au sein de la structure du récepteur reste homologue. Notamment, il est frappant de constater *a posteriori* que ces sites identifiés par modélisation correspondent à la poche occupée par l'extrémité du rétinol dans sa conformation active au sein de la structure de la bactériorhodopsine déterminée par cryomicroscopie électronique [1]. Cela vient valider le

choix de la bactériorhodopsine comme structure de référence et confirme la conservation structurale (sept domaines transmembranaires organisés en hélices  $\alpha$ ) et fonctionnelle (homologie des sites d'activation et des sites de couplage fonctionnel) au sein de cette superfamille des RCPG, et ce malgré leur diversité. Ces modèles apportent également un éclairage nouveau sur les relations structure-activité et permettent de rationaliser un certain nombre de principes, voire de dogmes, de la chimie thérapeutique.

Il serait cependant illusoire d'espérer rendre compte quantitativement de l'affinité de différents ligands pour leur récepteur. A titre indicatif, une différence d'affinité d'un facteur 10 ne correspond qu'à une différence d'environ 1,7 kcal/mole de l'énergie d'interaction ligand-récepteur, soit moins que l'énergie fournie par une simple liaison hydrogène. Il est clair qu'une telle précision ne saurait être accessible avec les modèles actuellement disponibles, qui reposent sur de nombreuses hypothèses et ne donnent qu'une image statique et partielle du phénomène. N'est notamment pas explicitement prise en compte l'influence de l'environnement et des autres composants moléculaires du système (effecteurs allostériques, protéine G, GDP, GTP, agrégation des récepteurs, phosphorylation, etc.). Ces modèles permettent cependant d'appréhender, au niveau moléculaire, des phénomènes qui ne pouvaient l'être auparavant. Ainsi on peut avancer quelques hypothèses suggérant comment un médiateur extracellulaire, quel qu'il soit, peut induire un changement conformationnel du récepteur au niveau des boucles cytoplasmiques, alors qu'il se fixe, à environ 2 nm de là, dans la partie transmembranaire.

### **Activation du récepteur par le ligand**

L'activation du récepteur correspondrait à une transition entre différents états d'équilibre du récepteur sous l'effet d'une perturbation locale. L'analyse des modèles tridimensionnels des RCPG non complexés permet de mettre en évidence un réseau dynamique d'interactions entre les

chaînes latérales des résidus des différentes hélices  $\alpha$  constituant la partie transmembranaire. Ainsi, dans les RCPG de médiateurs cationiques, on trouve un réseau de liaisons aromatique-aromatique se propageant de proche en proche, de la face extracellulaire du récepteur à la face cytoplasmique. Le phénomène de complexation du ligand peut induire une perturbation locale de ce réseau. La réorganisation des résidus aromatiques 613, 616 et 304 autour de la paire d'ions nous semble, de ce point de vue, déterminante, pouvant se répercuter de proche en proche et conduire à un nouvel équilibre permettant le couplage à la protéine G. Il est tout à fait remarquable que deux de ces trois résidus aromatiques « clés » identifiés par modélisation, se retrouvent dans la structure expérimentale de la bactériorhodopsine, entourant la double liaison du rétinol complexé qui active le récepteur en s'isomérisant. Formation d'une paire d'ions ou isomérisation de la liaison du rétinol pourraient ainsi avoir des conséquences similaires sur leur environnement immédiat identique et par répercussion sur l'activation du récepteur.

Ainsi que nous le notions brièvement auparavant, les résidus proline ou glycine hautement conservés au sein de certains domaines transmembranaires  $\alpha$ -hélicoïdaux contribuent très probablement à l'activation du récepteur en jouant un rôle de charnière. Des données expérimentales [28] indiquent que les deux portions d'hélice  $\alpha$  situées de part et d'autre d'un résidu proline oscillent spontanément. On peut imaginer que la modification du réseau des interactions entre les chaînes latérales décrites précédemment puisse modifier l'amplitude et la fréquence de ces oscillations et donc ainsi transmettre la perturbation induite par le médiateur à tout le squelette peptidique du récepteur. La conformation moyenne, à l'équilibre, du récepteur peut être modifiée et se traduire par une modification de l'accessibilité de la 3<sup>e</sup> boucle cytoplasmique, permettant ainsi le couplage à la protéine G.

Cette hypothèse (d'autres seraient envisageables, telle l'allostérie) revêt une certaine importance si l'on veut notamment tenter de comprendre ce

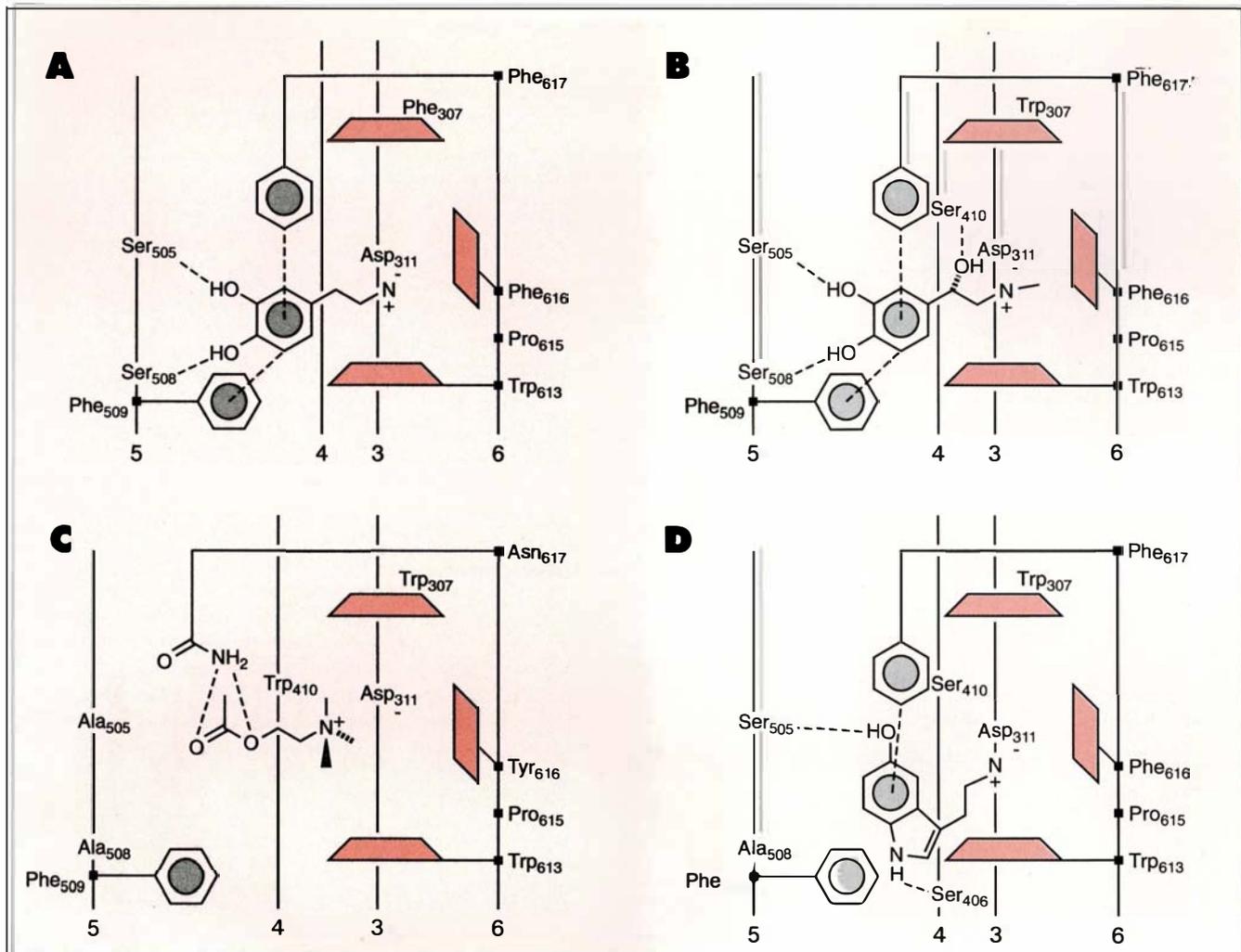


Figure 6. **Représentation des interactions entre dopamine (A), adrénaline (B), acétylcholine (C) et sérotonine (D), et, respectivement, les récepteurs  $D_2$ ,  $\beta_2$ ,  $m_2$  et  $5-HT_2$**  (reproduit d'après [2], avec l'autorisation de l'auteur).

qui différencie un agoniste d'un antagoniste ou d'un agoniste partiel.

En ce qui concerne les antagonistes, des résultats expérimentaux [18] suggèrent que l'aspartate 311 de l'hélice 3 est également impliqué dans leur fixation. De nombreuses questions restent cependant posées. Ces antagonistes se fixent-ils dans le même site que les agonistes ? Ce site est-il unique ? Comment inactivent-ils le récepteur ?

Plus délicat encore est le problème des agonistes partiels ; ces molécules se fixent avec une bonne affinité au récepteur mais n'induisent qu'une réponse biologique partielle. Les modèles discutés ici permettraient d'avancer quelques hypothèses rendant compte de ce comportement. Il importe cependant de démontrer

expérimentalement que la réponse fonctionnelle partielle observée résulte effectivement d'une interaction particulière entre ligand et récepteur et non d'une perte d'efficacité au cours des nombreux processus moléculaires intervenant entre la fixation du ligand et la production du messager secondaire. Une analyse fine et discriminante des constantes cinétiques et thermodynamiques de ces processus permettra de trancher.

Il est important de souligner que, bien que cette représentation tridimensionnelle des RCPG rende compte de la plupart des résultats expérimentaux disponibles, cela ne reste qu'un modèle, une source d'hypothèses nouvelles qui demanderont à être validées expérimentalement par mutagenèse dirigée ou mar-

quage d'affinité. Ce modèle devra également rendre compte qualitativement puis quantitativement des relations structure-activité et enfin servir à concevoir de nouveaux ligands plus puissants et sélectifs.

Malgré ses limites, ce modèle primitif représente une étape importante vers la compréhension de la structure et de la fonction des RCPG en attendant l'accès à leur structure cristallographique.

### Récepteurs couplés aux protéines G, sciences et médecine

A moyen terme, la détermination de la structure tridimensionnelle des récepteurs hormonaux par modélisation ou par des techniques expérimentales

tales devrait représenter une révolution dans le domaine de la chimie thérapeutique en permettant de rationaliser la conception de nouveaux composés biologiquement actifs. Il devient notamment possible d'analyser les différences structurales entre les multiples sous-types de récepteurs activés par un même médiateur ou par des médiateurs différents et de concevoir de nouveaux ligands, agonistes ou antagonistes, sélectifs de chaque sous-type. Par ailleurs, les techniques de biologie moléculaire permettent progressivement de caractériser tous les récepteurs pharmacologiques connus, mais aussi d'identifier de nouveaux récepteurs dont la fonction biologique reste à explorer. Ainsi s'ouvrent de nouvelles voies de recherche qui laissent espérer des progrès considérables pour la médecine et la biologie ■

## RÉFÉRENCES

26. Mian S, Bradwell A, Olson A. Structure, function and properties of antibody sites. *J Mol Biol* 1991 ; 217 : 133-51.
27. Satow Y, Cohen G, Padlan E, Davies D. Phosphocholine binding immunoglobulin Fab Mc PC603. An X-ray diffraction study at 2.7 Å. *J Mol Biol* 1986 ; 190 : 593-604.
28. Rigler R. Molecular recognition, allosteric receptors and drug design. Molecular structure, dynamics and interactions in bioactive membrane peptides. *Round Table*. Paris : *Roussel-Uclaf*, 1990 : 19-20.

## TIRÉS A PART

M.F. Hibert.

## Summary

### Three dimensional models of G protein-coupled receptors

G protein-coupled receptors (GPCR) represent a very important class of membrane embedded receptors. More than 60 different receptors belonging to this class have been cloned and sequenced. A detailed analysis of their primary sequences combined with experimental data led to the definition of a prototypic three-dimensional model of the trans-membrane domain derived from the published structure of bacteriorhodopsin defined by cryo-electron microscopy. This model allowed the analysis of the receptor-binding domain and a detailed, though qualitative, description of the neuromediator binding sites. Mechanisms for the receptor conformational change and activation were proposed and discussed.