

Université du Québec / INRS - Institut Armand-Frappier
Université de Rouen

Étude structurale du récepteur de l'urotensine-II et caractérisation du site de liaison.

Par
Stéphane Boivin

¹Laboratoire d'études moléculaires et pharmacologiques des peptides (LEMPP), INRS-
Institut Armand-Frappier, 245 boul. Hymus, Pointe-Claire, Qc, Canada, H9R 1G6

²Laboratoire de Chimie Organique et de Biologie Structurale, IFRMP 23, UMR 6014
CNRS, Université de Rouen, 76821 Mont Saint-Aignan, France

Thèse présentée pour l'obtention du grade de:

Philosophiae Doctor (Ph.D.), programme de Biologie¹
Philosophiae Doctor (Ph.D.), programme de Chimie²

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Alain Lamarre, INRS-Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche
Examineur interne

Pr Alain Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier

Pr Jim Omichinski, Université de Montréal

Directeur de recherche
Examineur interne
Examineur externe

Pr Daniel Davoust, Université de Rouen

Pr Hubert Vaudry, Université de Rouen

Pr Sylvie Rebuffat, Muséum National d'Histoire Naturelle

Thèse soutenue à l'INRS – Institut Armand Frappier, le 18 avril 2008

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ARTICLES	7
LISTE DES PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE.....	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	9
RÉSUMÉ	10
AVANT-PROPOS	14
REMERCIEMENT	15
INTRODUCTION	16
Chapitre 1: Revue de la littérature	19
1.1: Les RCPGs.....	20
1.1.1 Introduction aux RCPGs.....	20
1.1.2 Familles des RCPGs	23
1.1.4 Connaissance actuelle des sites de liaisons ligand/RCPG	28
1.1.5 Structure tridimensionnelle des RCPGs.....	32
1.1.6 Outils pour l'étude structurale des RCPGs.	36
1.1.7 Intérêts thérapeutiques des RCPGs.....	41
1.1.8 Addendum: le récepteur β 2-adrénérgique.....	42
1.2: Le système urotensinergique	50
1.2.1 L'urotensine-II	50
1.2.2 Le récepteur de l'urotensine-II.....	57
1.2.3 Étude structurale de U-II et UT	60
Chapitre 2: Les articles	68
2.1 Article 1	69
2.1.1 Mise en contexte de l'article 1	69
2.1.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1	70
2.1.3 Résumé et copie de l'article 1	72
2.2 Article 2	74
2.2.1 Mise en contexte de l'article 2	74

2.2.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2	76
2.2.3 Résumé et copie de l'article 2	78
Chapitre 3: Discussion & conclusion.....	80
3.1 Première partie: Identification des domaines de liaison	81
3.1.1. Choix des domaines structuraux	81
3.1.2 Prédiction de la topologie de UT	82
3.1.3 Synthèse des domaines structuraux	82
3.1.4 Analyse des interactions par RPS	86
3.2 Deuxième partie: Étude structurale.....	94
3.2.1 Analyse par dichroïsme circulaire	94
3.2.2 Analyses par RMN.....	98
3.3. Conclusion	117
3.4. Contribution à l'avancement des connaissances.....	118
3.5. Perspectives.....	119
ANNEXE	122
RÉFÉRENCES	125

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure générale des récepteurs couplés aux protéines G.	22
Figure 2. Densité électronique de la rhodopsine dans une membrane lipidique.	22
Figure 3. Mécanisme de signalisation des RCPGs.	27
Figure 4. Représentation des différents modes d'interaction.....	29
Figure 5. Densité électronique de la rhodopsine bovine et de la bactériorhodopsine dans une membrane lipidique.	34
Figure 6. Comparaison de la structure de la boucle intracellulaire (EC-I) et des boucles extracellulaires-II et -III (EC-II et EC-III) de la bactériorhodopsine obtenue par RMN et par cristallographie.	39
Figure 7. Caractérisation de la structure par RMN de fragments peptidiques en solution correspondant aux domaines structuraux de la rhodopsine.....	40
Figure 8 Structure tridimensionnelle de la myohémérythrine obtenue par cristallographie à une résolution de 1.8 Å (1A7D.pdb).	41
Figure 9. Structure cristalline à haute résolution du complexe β_2 -AR-T4L lié au carazolol	44
Figure 10. Comparaison de la face extracellulaire du β_2 AR-T4L et de la rhodopsine. ...	47
Figure 11. Précurseurs de hU-II: préproU-IIA et préproU-IIB.....	53
Figure 12. Structure du récepteur de l'urotensine-II humain (hUT).....	59
Figure 13. Squelette de carbone de l'U-II de gobie obtenu par RMN et minimisation moléculaire.	63
Figure 14. Identification par photomarquage des acides aminés du récepteur rUT impliqués dans le site de liaison de U-II et de l'urantide.	65
Figure 15. Représentation des domaines structuraux de UT synthétiques.	84
Figure 16. Immobilisation en RPS de micelles/EC-II sur une surface hydrophobe.	88
Figure 17. Structure de l'acide «dPEG ₄ TM -biotine» qui a été ajouté à l'extrémité N- terminale des domaines UT pour les analyses par RPS.	89
Figure 18. Résumé des résultats des tests de liaison par RPS de EC-II et EC-III.	90
Figure 19. Représentation de la seconde boucle extracellulaire de la rhodopsine bovine reliant les TM-IV et -V.	92

Figure 20. Résumé des résultats de l'analyse des domaines de UT par CD.....	97
Figure 21. Comparaison de la structure tridimensionnelle de a) la rhodopsine bovine déterminée par rayon-X (188.pdb) et de b) la structure de EC-III déterminée par RMN.....	102
Figure 22. Tableau des déplacements chimiques secondaires de EC-II dans le DPC à 313K.	105
Figure 23. Diagramme de connectivités NOEs de EC-II dans le DPC à 313K.	105
Figure 24. Superposition des atomes N, C α , C' du squelette EC-II entre les segments hélicoïdaux constitués par les résidus a) 183-192, et b) 205-209.	106
Figure 25. Distribution des NOEs et du RMSD pour EC-II.	107
Figure 26. Comparaison de la structure tridimensionnelle de a) la rhodopsine bovine déterminée par rayon-X (188.pdb) et de b) la structure de EC-II déterminée par RMN.....	109
Figure 27. Représentation mixte du récepteur UT construit à l'aide des données expérimentales provenant de l'analyse structurale par RMN de EC-II et EC- III.	111
Figure 28. Représentation de la structure partielle des domaines transmembranaires de la rhodopsine bovine (1F88.pdb) et de la distance les séparant.	111
Figure 29. Superposition des spectres TOCSY de EC-II sous sa forme libre (contour noir) et de EC-II/U-II (contour rouge) lors du titrage.	115
Figure 30. Agrandissement de la région correspondant au HN-H α du spectre TOCSY lors du titrage EC-II/U-II pour les résidus a) V184, b) M185 et c) R192.	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Séquences de U-II chez différents mammifères.	51
Tableau 2. Identité de séquence pour quelques isoformes du récepteur UT	59
Tableau 3. Description des fragments synthétiques de UT.....	86

LISTE DES ARTICLES

Boivin, S., Milazzo, S., Oulyadi, H., Guilhaudis L., Coadou, G., Fournier, A. & Davoust, D. (2008) Solution Structure of Extracellular Domain Loop-III of Urotensin-II Receptor & Characterization of the Interaction with Urotensin-II. *Peptide*, 29(5):700-710

Boivin S., Guilhaudis L., Milazzo I., Ouliady H., Davoust D. & Fournier A. (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP and Urantide. *Biochemistry*, 45(19):5993-6002.

(Autres publications non-incluses dans la Thèse)

Boivin, S., Milazzo, S., Oulyadi, H., Guilhaudis L., Coadou, G., Fournier, A. & Davoust, D. (2006) NMR study of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP and Urantide.(*Peptides 2006, Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*)

Thuau R., Guilhaudis L., Milazzo I., Chartrel N., Oulyadi H., **Boivin S., Fournier A., Leprince J., Davoust D. & Vaudry H. (2005) Structural study of 26RFa by NMR spectroscopy. *Peptides*, 26(5):779-789.**

LISTE DES PRÉSENTATIONS PAR AFFICHE

- Ségalas-Milazzo I., Guilhaudis L., **Boivin S.**, Oulyadi H., Coadou G., Carlier L., Fournier A. & Davoust D. Solution structure of two extracellular loops of urotensin-II receptor and NMR characterization of their interaction with urotensin-II. XIIth European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. Bobigny, France (septembre 2007).
- Ségalas-Milazzo I., **Boivin S.**, Guilhaudis L., Oulyadi H., Coadou G., Fournier A. & Davoust D. Solution structure of extracellular loop III of urotensin-II receptor and NMR characterization of its interaction with urotensin-II. European Magnetic Resonance Conference. Tarragone, Espagne (juillet 2007).
- Boivin S.**, Ségalas-Milazzo I., Guilhaudis L., Oulyadi H., Fournier A. & Davoust D. Étude structurale de la boucle extracellulaire III du récepteur UT. Caractérisation de l'interaction avec l'urotensine-II. 13^e rencontre de l'IFRMP. Havre, France (juin 2007).
- Boivin S.**, Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP and Urantide. 29th European Peptide Symposium. Gdańsk, Pologne (septembre 2006).
- Boivin S.**, Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. Structural characterization of urotensine-II receptor and identification of agonists and antagonists binding site. Meeting of Club de Recherches Cliniques du Québec, Lac à l'Eau Claire, Canada (septembre 2006).
- Boivin S.**, Milazzo I., Guilhaudis L., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. Étude de l'interaction entre l'urotensine-II et des domaines de son récepteur. 11^e rencontre de l'IFRMP meeting. Rouen, France (juin 2005).
- Boivin S.**, Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. Études structurales par dichroïsme circulaire de domaines du récepteur de l'urotensine-II. Congrès de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec (janvier 2005).
- Boivin S.**, Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. Structural study of urotensin-II receptor domains using circular dichroism spectroscopy. Joint meeting Great Lakes GPCR Retreat, Bromont, Quebec, Canada. (novembre 2004).
- Boivin S.**, Guilhaudis L., Milazzo I., Oulyadi H., Davoust D. & Fournier A. (2004) Structural study of urotensin-II receptor domains using circular dichroism spectroscopy. Symposium Peptide Receptors. Montréal, Québec, Canada. (juillet 2004).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACN :	acétonitrile
BPA :	<i>p-benzoyl-L-phenylalanine</i>
CMC:	concentration micellaire critique
DMSO:	diméthylsulfoxyde
DPC:	dodécylphosphocholine
EC:	boucle extracellulaire
HFIP:	hexafluoroisopropanol
CLHP:	chromatographie en phase liquide à haute performance
IC:	boucle intracellulaire
MALDI-TOF :	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
NOE :	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY :	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ORN :	<i>ornithine</i>
PEN:	<i>penicillamine</i>
RCPG:	récepteur couplé aux protéines G
RMN:	résonance magnétique nucléaire
SDS :	sodium dodécylsulfate de sodium
RPS:	résonance plasmonique de surface
TFE:	trifluoroéthanol
TM:	segment transmembranaire
U-II:	urotensine-II
URP:	<i>urotensin-II related peptide</i>
UT:	récepteur de l'urotensine-II

RÉSUMÉ

Les récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs) constituent, par leur complexité et leur diversité, une cible intéressante pour le développement d'outils pharmacologiques. Le récepteur UT (UT) fait partie de cette grande famille et est impliqué dans la régulation de l'activité biologique du plus puissant peptide vasoconstricteur identifié à ce jour chez l'homme, l'urotensine-II (U-II). Le récepteur UT ainsi que U-II sont, entre autres, présents au niveau du système cardiovasculaire humain. Tous deux représentent de nouvelles cibles intéressantes pour le développement d'outils pharmacologiques utiles pour étudier la physiologie et certaines pathologies du système vasculaire. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de l'activation complète ou partielle de UT sont encore loin d'être clairement élucidés. Étant donné l'intérêt thérapeutique que peut présenter le développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs pour ce récepteur, la compréhension de ces mécanismes constitue un enjeu majeur.

Une meilleure compréhension des mécanismes d'activation de UT implique l'identification de son domaine de liaison et l'élucidation de sa structure tridimensionnelle. Cependant, la caractérisation structurale des récepteurs transmembranaires heptahéliques, dont UT, demeure une tâche fastidieuse à cause de leur faible solubilité en général et de forte taille, sans oublier le risque que représente la dénaturation lors des étapes de purification. Ceci rend donc leur analyse structurale par des voies classiques, telles que la RMN et la cristallographie, très complexe voire impossible.

Depuis les années 2000, une voie alternative a été utilisée pour caractériser par RMN la structure de grosses protéines. Cette nouvelle approche est basée sur l'analyse des segments individuels ou des domaines structuraux de la protéine, c'est-à-dire les boucles intra- et extracellulaires et/ou les segments transmembranaires dans le cas d'une protéine membranaire tel un RCPG. Cette technique a d'ailleurs été utilisée pour élucider avec succès la structure de la rhodopsine bovine et de la bactériorhodopsine. Plus

précisément, la caractérisation structurale de tous leurs domaines structuraux par RMN et leur juxtaposition subséquente a permis d'élucider la structure complète de ces protéines membranaires dans leur forme native alors qu'auparavant seule leur structure cristallographique avait été décrite. Ces études suggèrent que la structure secondaire des domaines transmembranaires ainsi que des boucles cellulaires des RCPGs est stabilisée par des interactions à courtes distances gouvernées par la structure primaire rendant possible leur caractérisation structurale totale par le biais de l'analyse de sous fragments. De plus, une analyse similaire de la myohémérythrine, une protéine membranaire n'appartenant pas au RCPG, suggère que cette méthodologie ne se limiterait pas uniquement à l'étude structurale des RCPGs, mais pourrait être appliquée à l'étude de l'ensemble des protéines membranaires. Cette stratégie offre ainsi une approche très intéressante pour l'étude structurale de UT.

Mon projet de doctorat avait pour but de caractériser le complexe U-II/UT d'abord en identifiant le rôle de certains domaines structuraux de UT dans le processus de reconnaissance et d'activation en relation avec U-II, et ensuite en apportant des données sur la structure tridimensionnelle de ces domaines. Cette étude apporte donc de nouvelles données qui contribuent à une meilleure connaissance générale du complexe U-II/UT ce qui pourrait représenter un atout supplémentaire pour le développement et/ou le raffinement d'outils pharmacologiques destinés à l'étude du système cardiovasculaire. Elle contribue également à une meilleure compréhension structurale des RCPGs qui, malgré leur importance biologique, demeurent à ce jour peu caractérisés.

Les objectifs du projet de recherche ont été de 1) cibler et développer par synthèse peptidique des segments de UT représentant des domaines structuraux susceptibles d'interagir avec U-II, 2) déterminer leur capacité à interagir avec des ligands connus de UT à l'aide de la résonance plasmonique de surface (RPS), et 3) caractériser par CD, RMN et par modélisation moléculaire l'arrangement tridimensionnel des domaines jouant un rôle clef dans le complexe U-II/UT. Ainsi, la réalisation de ce projet a reposé sur l'utilisation combinée d'approches expérimentales originales basées sur des méthodes chimiques et spectroscopiques couplées à des techniques de modélisation moléculaire

reposant sur des données théoriques. À cet égard, cinq domaines structuraux ont été construits par synthèse peptidique en phase solide : trois boucles extracellulaires (EC-I, EC-II et EC-III) et deux segments transmembranaires (TM-III et TM-IV). Par la suite, l'affinité de ces domaines pour différents ligands de UT, soit deux agonistes (U-II et URP) et un antagoniste (Urantide), a été déterminée par RPS. Cette étude a permis d'établir expérimentalement la participation de la boucle extracellulaire-II du récepteur UT dans la liaison sélective des agonistes U-II et URP, et de l'antagoniste Urantide. Les résultats de cette étude ont également démontré que contrairement à la boucle extracellulaire-II, la boucle extracellulaire-III ne peut lier sélectivement que les agonistes U-II et URP. Ces résultats suggèrent donc que U-II et Urantide lient EC-II selon un mécanisme commun alors que la liaison avec EC-III jouerait davantage un rôle clé dans le processus d'activation du récepteur UT. Ainsi, il est possible de concevoir que de puissants antagonistes pourraient être développés en produisant des ligands de haute affinité ciblant la boucle EC-III. L'arrangement structural des domaines extracellulaires-II et -III a par la suite été caractérisé à l'aide du dichroïsme circulaire, de la RMN et de la modélisation moléculaire. De plus, l'arrangement moléculaire de ces domaines a pu être déterminé dans un environnement micellaire. Nos résultats confirment la propension des fragments peptidiques de UT à adopter une conformation moléculaire organisée en solution. Plus précisément, les résultats ont montré que les domaines EC-II et EC-III adoptent une géométrie spatiale bien définie au niveau de l'interface des domaines transmembranaires et des boucles extracellulaires pouvant mettre en évidence des éléments structuraux et chimiques essentiels pour la liaison de U-II. Enfin, une étude complémentaire explorant par RMN le complexe EC-III/U-II et EC-II/U-II a été réalisée afin d'identifier des interactions se manifestant entre des domaines synthétiques de UT et U-II. Le titrage par RMN du complexe EC-II/U-II et EC-III/U-II a permis de suggérer certains déterminants ou résidus-clés composant le site de liaison de U-II.

Nos travaux visant à identifier et à caractériser le site de liaison de U-II ont donc conduit à une meilleure compréhension des bases moléculaires de l'activation de UT par U-II, mais également par l'URP et par l'Urantide. Enfin, notre étude permettra de mieux définir certaines propriétés de UT et pourraient mener à la conception de nouveaux outils moléculaires intéressants.

AVANT-PROPOS

Mon doctorat a été réalisé dans le cadre d'une cotutelle de thèse Québec-France* sous une supervision conjointe par le Pr Alain Fournier de l'INRS-Institut Armand-Frappier, et par le Pr Daniel Davoust de l'Université de Rouen. Pour ce faire, j'ai été inscrit simultanément dans un établissement d'enseignement supérieur québécois et français. Ainsi, le projet de recherche a été réalisé conjointement dans les deux établissements : le travail en France s'est échelonné en plusieurs séjours totalisant 12 mois et le reste des activités de recherche de mon doctorat s'est déroulé au Québec. Le travail effectué dans le cadre de la cotutelle a été réalisé de façon à respecter les exigences en vigueur dans les deux établissements afin qu'il en résulte l'obtention de deux diplômes, soit un Ph.D. français en chimie, et un Ph.D. québécois en biologie.

**Ce programme a été développé dans le cadre de la Convention-cadre de 1996 entre le Québec (Conférence des recteurs et des principaux des universités du Québec - CREPUQ) et la France (Conférence des présidents d'université – CPU et la Conférence des directeurs d'écoles et de formations d'ingénieurs – CDEFI).*

REMERCIEMENT

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Pr Alain Fournier et au Pr Daniel Davoust, directeurs de ma thèse, pour m'avoir accordé leur confiance en m'accueillant dans leur laboratoire respectif. Ils ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Ils n'ont pas cessé, par leurs compétences, leur rigueur, leur dynamisme et leurs encouragements de stimuler ce travail de recherche. Qu'il me soit permis ici de leur témoigner ma sincère admiration.

Je remercie chaleureusement Laure Guilhaudis, Isabelle Ségalas-Milazzo, Gael Coadou et Hassan Oulyadi pour leur gentillesse et leur patience. Leurs qualités scientifiques m'ont permis de me familiariser avec la biologie structurale.

Je tiens à exprimer toute mon amitié à mes collègues du LEMPP et de l'IRCOF présents ou passés, qui sont trop nombreux pour être tous cités. Qu'ils soient remerciés pour leur accueil et leur gentillesse. Je tiens cependant à saluer particulièrement mes complices Anne, Franck et l'irremplaçable Delphine (Lolita), avec qui une grande amitié s'est formée. Mes séjours en France sont remplis de moments mémorables. Un grand merci également à Myriam pour ces qualités incontournables de pédagogue et à Kathy, une extraordinaire coéquipière de duathlon (*Les disaccharides*).

Je souhaite aussi remercier ma famille & Karine pour leurs nombreux encouragements et leur appui inconditionnel.

Dans un dernier temps, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et génie (CRSNG) du Canada, le FRSQ, le Ministère de l'Éducation du Québec, le gouvernement de la France ainsi que la Fondation Armand-Frappier pour leur soutien financier.

INTRODUCTION

Une maladie cardiovasculaire est une pathologie ou une lésion touchant les structures cardiaques et/ou vasculaires. En fait, au Canada, les maladies cardiovasculaires, comprenant l'insuffisance coronarienne, l'arythmie, l'accident vasculaire cérébral, l'infection cardiaque d'origine virale, l'hypertension artérielle et la myocardite, sont la principale cause de décès. Un décès sur trois au pays est attribuable aux maladies du cœur (et aux AVC) dont 10 % sont imputables à des troubles vasculaires tels l'hypertension artérielle et le durcissement des artères. Même si l'hypertension n'est pas en soi une condition mortelle, cette affection silencieuse touche une personne sur cinq au Canada et augmente le risque d'avoir un infarctus ou une attaque cérébrale. C'est pourquoi tant d'efforts sont investis dans le but de contrôler adéquatement la pression artérielle. Selon une étude menée en 1994 par la Fondation des maladies du cœur du Canada, les maladies cardiovasculaires coûtent plus de 18 milliards de dollars par année aux canadiens et canadiennes. Malgré les traitements disponibles, il n'en demeure pas moins que la maladie cardiovasculaire cause annuellement au Canada le décès de 80 000 à 100 000 personnes. Face à un tel fléau, la prévention, le dépistage et le traitement demeurent le pilier de cette lutte. Actuellement, il existe plusieurs médicaments pour le traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque. Cependant, ceux-ci ne conviennent pas à tous ou peuvent occasionner des effets secondaires. De nouvelles stratégies pharmacologiques doivent donc être développées afin d'améliorer la pharmacologie relative à la santé du cœur et des vaisseaux sanguins. Depuis l'achèvement du projet «Génome Humain», ceci a permis l'identification de nombreux gènes codant pour des peptides et des récepteurs qui constituent, par leur complexité et leur diversité, une cible intéressante pour le développement d'outils pharmacologiques. D'ailleurs, les récepteurs à sept passages transmembranaires représentent aujourd'hui entre 40-50% des cibles des médicaments produits par l'industrie pharmaceutique (1).

La caractérisation de la fonction biologique de ces récepteurs et l'identification de leur ligand naturel mènent généralement à de nouvelles voies thérapeutiques spécifiques pour l'une ou l'autre des physiopathologies humaines ou animales et bien entendu, il en va de même pour le système cardiovasculaire. C'est ainsi que le récepteur orphelin (oRCPG) GPR14, une protéine exprimée dans le système cardiovasculaire humain et tout particulièrement au niveau du cœur et des artères coronaires, a fait l'objet de recherches afin de découvrir son ligand endogène. C'est en 1999, que ce récepteur a été «déorphelinisé» puisque son ligand naturel, l'urotensine-II (U-II), a été identifié. À ce jour, ce peptide s'avère être le plus puissant agent vasoconstricteur de l'aorte de rat, dépassant de 10 fois la puissance de l'endothéline-1 (ET-1), un constricteur connu participant à l'homéostasie de la pression sanguine. De plus, il a été démontré chez l'humain que U-II circule librement dans le plasma et que cette hormone pourrait ainsi agir, elle aussi, comme un important médiateur du tonus vasculaire. Malgré que l'U-II provoque une puissante vasoconstriction chez le rat, la souris, le chien et le primate, chez l'homme, les premiers effets observés sont paradoxaux, allant de la vasodilatation à la vasoconstriction, dépendamment du tissu utilisé. De plus, la présence de l'endothélium semble avoir un impact sur la nature de la réponse biologique, et ceci en fonction du lit vasculaire étudié. Plusieurs travaux tentent donc présentement de préciser l'activité de U-II chez l'homme et d'établir entre autres son rôle dans le contrôle du tonus vasculaire. Il est donc acquis qu'une meilleure caractérisation biologique de U-II, combinée à l'élucidation de son mécanisme d'action à l'échelle moléculaire, pourraient permettre le développement d'outils pharmacologiques destinés à établir le niveau de participation de ce peptide dans les affections du système cardiovasculaire. C'est dans cette optique que nous avons entrepris des travaux afin de caractériser le domaine de liaison de l'U-II sur son récepteur UT et d'identifier les résidus du récepteur participant à l'interaction avec le ligand.

De nombreuses recherches sur U-II ont été menées depuis la découverte de ce peptide. L'originalité de nos recherches repose sur le fait que nous avons étudié la structure secondaire du récepteur qui demeure à ce jour inconnue. Pour ce faire, nous avons employé une approche dite «segmentaire» pour évaluer la participation de certains domaines structuraux de UT afin de caractériser l'interaction entre U-II et son récepteur. Cette technique utilisée pour étudier les interactions ligands-protéines n'a jamais été utilisée avec UT. Notre étude nous a alors conduits à l'identification des domaines extracellulaires II et III de UT, et même plus précisément à quelques résidus, qui seraient impliqués dans la liaison avec U-II. L'identification du site de liaison pourra permettre le développement de nouveaux outils pharmacologiques voire thérapeutiques ou diagnostiques. Les différents objectifs spécifiques associés à ce projet de recherche, soit l'identification et la caractérisation du site de liaison de U-II avec UT sont:

1. Synthétiser sur phase solide des segments ou domaines structuraux de UT.
2. Évaluer l'affinité et la sélectivité de U-II, URP et de l'Urantide pour ces domaines synthétiques de UT par RPS.
3. Explorer la structure secondaire de ces domaines par dichroïsme circulaire dans différents milieux.
4. Élucider la conformation des domaines structuraux par modélisation moléculaire sous contraintes établies par RMN.
5. Caractériser les interactions entre le ligand et un domaine de UT par titrage en RMN.

Chapitre 1: Revue de la littérature

1.1: Les RCPGs

1.1.1 Introduction aux RCPGs

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) constituent la plus grande classe de récepteurs endocriniens membranaires du corps humain. Sur les 30 000 gènes du génome humain, plus de 600 gènes coderaient des RCPGs. À ce jour, il existe environ 200 types de RCPGs, sans compter les récepteurs olfactifs qui appartiennent également aux RCPGs et qui comptent de 400 à 1000 récepteurs différents. Les RCPGs sont des protéines transmembranaires capables de reconnaître des messages aussi différents que la lumière, les odeurs, les molécules du goût, des hormones ou des neurotransmetteurs. L'activation des RCPGs peut induire un large spectre de réponses cellulaires impliquées dans tous les aspects de la physiologie humaine. Par exemple, les RCPGs sont impliqués dans la régulation du sommeil, de la pression sanguine, de l'humeur, de l'appétit, de la perception, de la croissance cellulaire et dans la réponse immunitaire. Même si dans certains cas, les ligands endogènes et la fonction biologique de certains RCPGs demeurent à ce jour inconnus, les RCPGs constituent, de par leur position d'intermédiaire dans la transduction des signaux, d'importants médiateurs en contrôlant l'activation d'un réseau d'effecteurs intracellulaires responsables des réponses biologiques.

Les RCPGs sont des protéines de longueur variable qui traversent sept fois la bicouche lipidique formant ainsi sept domaines structuraux, soit sept hélices transmembranaires (TM-I à TM-VII) reliées par trois boucles extracellulaires (EC-I, EC-II, EC-III) et trois boucles intracellulaires (IC-I, IC-II, IC-III) (Figure 1). Cette architecture est commune à tous les RCPGs. L'extrémité amino-terminale de la protéine est extracellulaire et l'extrémité carboxy-terminale est intracellulaire. Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles comme la N-glycosylation au niveau des domaines extracellulaires, et la palmitoylation au niveau des domaines intracellulaires. Cette dernière modification peut former un ancrage lipidique dans la membrane et ainsi créer une quatrième boucle intracellulaire, soit IC-IV (Figure 1).

La connaissance de l'arrangement structural général des domaines transmembranaires des RCPGs provient initialement de l'analyse en microscopie électronique de la rhodopsine, un récepteur visuel des cellules en bâtonnet de la rétine (2). Cette technique a permis de confirmer la présence et de définir la morphologie des sept domaines transmembranaires (7TMs) de ce récepteur (Figure 2) (3). Même si pour la grande majorité des autres RCPGs, la présence des sept passages transmembranaires est spéculative car leur structure secondaire est fondée uniquement sur l'analyse hydropathique de la protéine, aucune expérience n'est venue confirmer cette structure. Ces sept segments transmembranaires constituent le "corps central" de ces récepteurs. Un changement de conformation de cette région induit par la présence d'un ligand est responsable de l'activation des RCPGs (4).

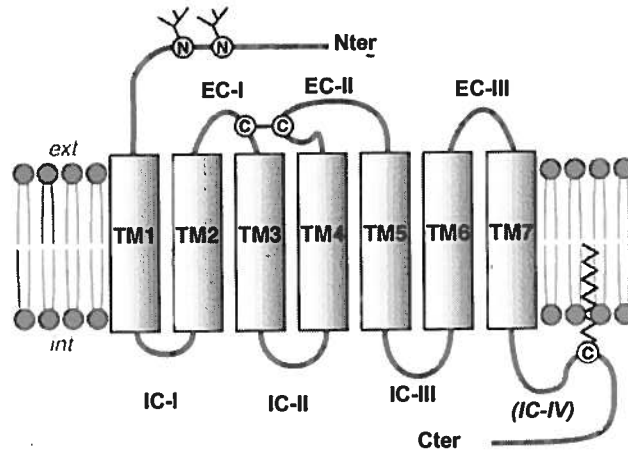


Figure 1. Structure générale des récepteurs couplés aux protéines G.

Les sept hélices transmembranaires antiparallèles hydrophobes (TM-I à TM-VII) sont reliées par trois boucles intracellulaires (IC-I, IC-II, IC-III) et trois boucles extracellulaires (EC-I, EC-II, EC-III). Un pont disulfure relie EC-I à EC-II. L'extrémité amino-terminale (Nter) est extracellulaire et l'extrémité carboxy-terminale (Cter) est intracellulaire.

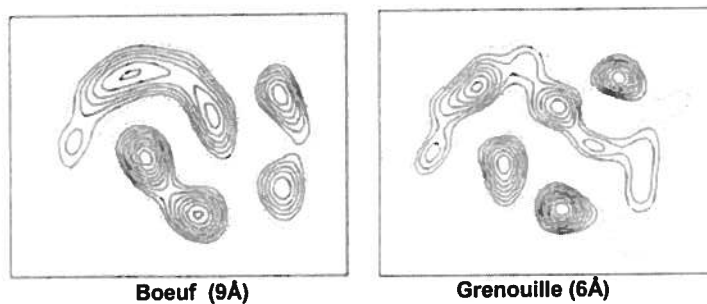


Figure 2. Densité électronique de la rhodopsine dans une membrane lipidique.

De gauche à droite, on peut observer la rhodopsine de bœuf et de grenouille à des résolutions de 0.9 nm et 0.6 nm, respectivement. La vue est observée depuis le dessus de la membrane et montre de l'organisation des sept segments transmembranaires. (D'après Schertler et al. 1995 (3)).

1.1.2 Familles des RCPGs

Chez les vertébrés, plusieurs familles de récepteurs heptahéliques peuvent être définies selon leur similarité au niveau de leur séquence en acides aminés et selon la localisation du site de liaison des ligands endogènes. Les récepteurs de la famille 1, de loin les plus nombreux, et des familles 2 et 3 sont les mieux caractérisés. Le couplage aux protéines-G des récepteurs des autres familles (familles 4 et 5) reste à démontrer pour la plupart d'entre eux.

La famille 1: rhodopsine/ β 2-adrénérique

Cette famille comprend la majorité des récepteurs heptahéliques, y compris les récepteurs olfactifs. Les récepteurs de cette famille ont été largement étudiés et s'apparentent à la rhodopsine (5) et au récepteur β 2-adrénérique (6). L'homologie globale parmi les récepteurs de cette famille est faible et restreinte à un petit nombre d'acides aminés. Ces acides aminés homologues et certaines séquences font la signature de ce groupe. Ces résidus fortement conservés semblent jouer un rôle essentiel au niveau de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle du récepteur. Un de ces résidus conservés au sein de tous les récepteurs de cette famille est l'arginine du motif commun E/DRY, situé au niveau de la jonction cytoplasmique du TM-III (7, 8). Un acide aspartique présent dans le TM-II est également important pour le couplage aux protéines G et pour le positionnement de l'arginine de la séquence E/DRY. Pour la majorité de ces récepteurs, une cystéine palmitoylée est retrouvée au niveau de l'extrémité C-terminale permettant la formation d'une quatrième boucle intracellulaire. De plus, deux cystéines forment un pont disulfure entre les boucles extracellulaires EC-I et EC-II et des acides aminés (P, F, N) dans les domaines TM-VI et TM-VII sont importants pour l'activation. De façon générale, l'analyse des séquences primaires des RCPGs révèle que les régions transmembranaires sont les plus conservées, alors que les boucles hydrophiles présentent des divergences plus grandes. Les homologies de séquence suggèrent un rôle pour ces résidus conservés dans la structuration de la molécule, et dans le mécanisme d'action

commun à cette famille de RCPGs. Enfin, la famille 1 peut être divisée en trois sous-groupes selon la localisation probable du site de liaison des ligands endogènes.

Sous-groupe 1a

Le sous-groupe 1a contient les récepteurs des petits ligands comme les amines, les nucléotides, ainsi que les stimuli visuels, gustatifs et olfactifs. Les prototypes dans ce groupe sont la rhodopsine et le récepteur β -adrénergique.

Sous-groupe 1b

Le sous-groupe 1b comprend les récepteurs des peptides, de certaines cytokines et de la thrombine. Le site de liaison de l'agoniste implique la partie N-terminale, les boucles EC-I, EC-II et EC-III ainsi que les parties adjacentes des domaines transmembranaires. Nous retrouvons dans ce sous-groupe les récepteurs de plusieurs ligands: cholécystokinine, endothéline, tachykinine, urotensine-II, thyrotropin-releasing hormone, neurotensine, neuropeptide Y, etc.

Sous-groupe 1c

Le sous-groupe 1c réunit les récepteurs des grosses hormones glycoprotéiques (thyrotropine, lutropine, follitropine) dont le site de liaison est essentiellement localisé dans la partie N-terminale externe. Ce domaine est souvent très long (350-400 acides aminés) et contient des motifs répétés de 20 résidus riches en leucine. L'activation du corps central s'effectue par interaction avec les boucles EC-I et EC-II (9).

La famille 2: glucagon/VIP/calcitonine

La famille 2 regroupe un nombre plus restreint de récepteurs pour des hormones peptidiques comme le glucagon, le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, le vasoactive intestinal peptide ou la sécrétine. Le site de liaison implique le domaine N-terminal, au moins la boucle EC-I et peut-être le TM-I (10).

La famille 3: métabotropique du glutamate/récepteur du calcium

La famille 3 regroupe depuis longtemps les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et un récepteur "calcium-sensing" (CaR) chargé de détecter les concentrations extracellulaires de Ca^{++} au niveau des glandes parathyroïdes. Elle s'est enrichie de nouveaux membres en 1997 : les récepteurs de type β de l'acide γ -aminobutyrique (GABAB) et une sous famille de récepteurs aux phéromones des vertébrés (VR1, Go VN1, Go VN2) (11, 12). Le site de liaison des récepteurs de cette famille est localisé entre deux lobes formés par le repliement du domaine N-terminal.

Les familles 4 et 5

Les familles 4 et 5 sont encore à ce jour faiblement caractérisées. La famille 4 a été identifiée en 1995 lors du clonage d'un certain nombre de récepteurs exprimés dans les neurones sensoriels (VN1, VN4, VN6) (13). Ces protéines constituent probablement des récepteurs pour certaines phéromones reconnues pour agir sur ces cellules. Mis à part ces récepteurs, aucun autre membre de cette famille n'a encore été identifié. Leur site de liaison et leur mode d'activation restent encore à découvrir. La famille 5 est constituée d'un grand nombre de récepteurs impliqués, entre autres, dans le développement chez la drosophile. Ces récepteurs sont particuliers car leur activité est en permanence inhibée par un autre récepteur à 10 TM, "*patched*".

1.1.3 Mécanisme de signalisation des RCPGs

L'effet biologique des ligands s'exerce à travers les RCPGs qui jouent un rôle d'intermédiaire entre les milieux extracellulaire et intracellulaire. Pour tous les RCPGs, les sites de liaison des ligands agonistes ont été décrits comme faisant intervenir des acides aminés situés soit exclusivement au niveau des parties extracellulaires du récepteur ou des hélices transmembranaires, soit à la fois au niveau des hélices et des domaines extracellulaires. Ces sites sont donc situés à distance des parties intracellulaires des récepteurs, c'est-à-dire hors de portée des sites potentiels de couplage aux protéines G ou à d'autres protéines intracellulaires. Par conséquent, l'activation des protéines G implique que les effets produits par l'arrivée du ligand agoniste au niveau de son site récepteur soient transmis au niveau de la partie du récepteur susceptible d'interagir avec les protéines G. Une explication simple de ce processus est que le récepteur, à l'état inactif (R), adopte une conformation énergétiquement stable dans laquelle les résidus cytoplasmiques nécessaires à l'activation des protéines G restent inaccessibles. La liaison d'un agoniste sur le récepteur va abaisser la barrière énergétique du système, qui va alors transiter vers un nouvel état stable actif (R*). En permettant un réarrangement des réseaux d'interactions qui stabilisaient la conformation inactive, et en provoquant ainsi des modifications structurales du récepteur, l'activation par le ligand pourrait alors permettre aux séquences impliquées dans le couplage avec les protéines G de devenir accessibles.

Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur a un effet sur l'ensemble du récepteur et sur la protéine G associée aux domaines intracellulaires. La perturbation conformationnelle entraîne, entre autres, la dissociation des 3 sous-unités constituant la protéine G (α , β , γ), ce qui libère sa sous-unité $\beta\gamma$ de α . Cette rupture modifie à son tour la structure de α qui perd son affinité pour le nucléotide GDP, qui est expulsé et remplacé par le GTP. A ce moment, la protéine G est activée. Ces protéines G activent à leur tour toute une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, transporteurs, etc.). Ces effecteurs permettent la plupart du temps, la modulation de la concentration intracellulaire de messagers secondaires tels l'AMPc, l'IP₃, le calcium et les

diacylglycérols (DAG). La modulation positive ou négative se fait par une protéine Gq ou Gi respectivement (Figure 3). Dans le cas de la voie impliquant une protéine Gq, la sous-unité α munie du GTP s'accroche à l'adénylyl cyclase (AC) dont l'activation immédiate conduit à la synthèse d'AMPc. A l'opposé, les récepteurs qui exercent un contrôle inhibiteur sur la voie de la transduction AMPc dépendante diminuent, suite à leur activation, les taux d'AMPc via une protéine Gi et facilitent l'ouverture des canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation. Tant que le récepteur est activé par son ligand, et tant que le système ne subit pas une désensibilisation, le cycle d'échange du GDP par le GTP continue. La dissociation du ligand ou l'internalisation du complexe suivi par le recyclage du récepteur provoque le retour à l'état initial.

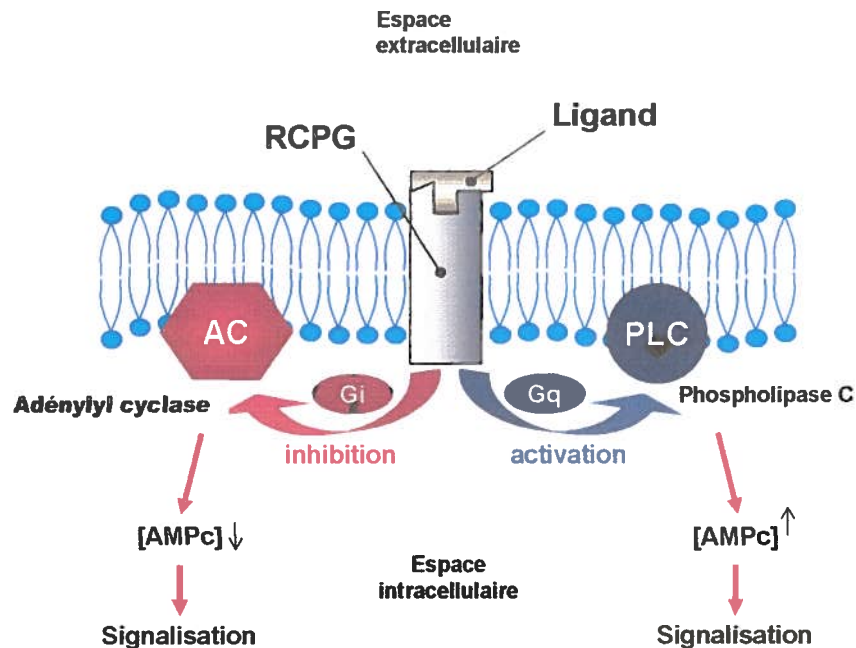


Figure 3. Mécanisme de signalisation des RCPGs.

Suite à la liaison d'un agoniste, le récepteur subit un changement conformationnel. Ce changement de conformation est transmis à l'ensemble de la structure et provoque l'activation d'une protéine G. La protéine G activée a le potentiel d'induire différentes cascades de signalisation intracellulaire selon la nature de la protéine G, soit Gi ou Gq.

1.1.4 Connaissance actuelle des sites de liaisons ligand/RCPG

Les RCPGs sont capables de reconnaître une très grande variété de ligands, distincts à la fois au niveau de leur structure chimique ou encore de leur taille (Figure 4). Ceci suggère également que le mode de liaison des ligands sur leur récepteur peut présenter une grande diversité. Le schéma général d'activation des RCPGs met en jeu des processus communs à tous ces récepteurs, mais les bases moléculaires précises à l'origine de l'activation, qui peut être totale ou partielle, restent encore à élucider. Certains déterminants structuraux présents dans les RCPGs sont importants pour l'interaction avec le ligand ou l'activation de la protéine G.

La combinaison de différentes stratégies a permis, dans certains cas, de mettre en évidence les déterminants structuraux de la liaison du ligand et de l'activation fonctionnelle des récepteurs. Les techniques employées incluent la mutagenèse dirigée, la construction de récepteurs chimères, l'identification et la caractérisation de mutations naturelles qui modifient la fonction du récepteur, l'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes du récepteur, l'utilisation de peptides synthétiques correspondant à des morceaux de séquence du récepteur, le marquage par photoaffinité, ou encore d'autres approches de marquage chimique, et notamment les études «methionine proximity assay».

Les sites de liaison des petites molécules endogènes à l'intérieur des récepteurs de la famille 1, par exemple le site de liaison du rétinol sur la rhodopsine ou celui des catécholamines sur les récepteurs adrénergiques, sont certainement les mieux caractérisés. Cependant, depuis ces dernières années, des données ont également été apportées sur les domaines d'interaction d'autres classes de ligands. En particulier, les sites de liaison des ligands sur les récepteurs aux peptides présentent un intérêt spécifique, dû à la découverte de nombreuses petites molécules non peptidiques capables d'agir sur ces récepteurs en tant qu'agonistes ou antagonistes, et ceci avec une grande efficacité.

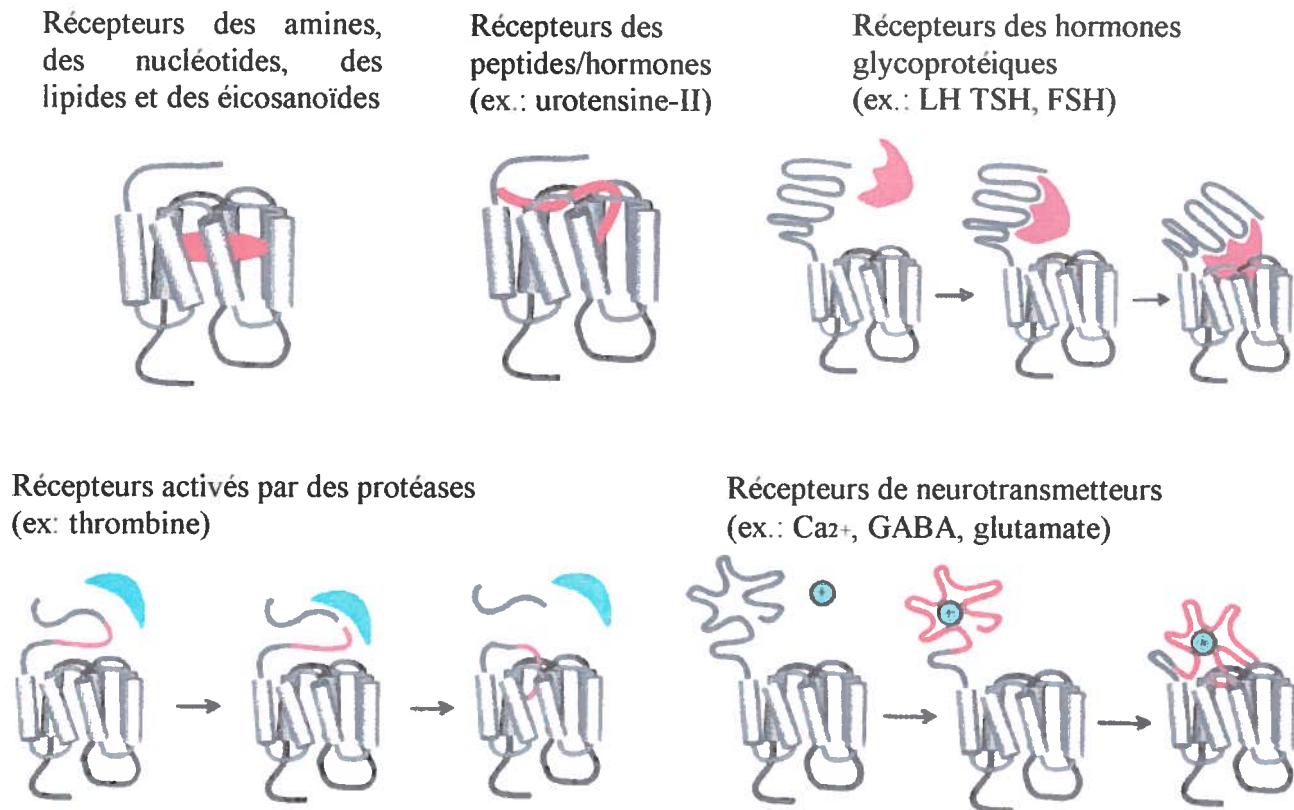


Figure 4. Représentation des différents modes d'interaction.

Les récepteurs membranaires de type RCPGs compte jusqu'à environ 1000 membres. Ces récepteurs permettent le passage du signal venant du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire suite à l'interaction avec un ligand de nature et de taille varié tel qu'un photon, un peptide, une hormones, un ion, etc. (D'après Boackert et Pin, 1999 (4) et Ji et al. 1998 (14)).

La combinaison des différentes approches a permis de définir, parmi les familles de RCPGs, trois grandes classes de sites de liaison pour les ligands. Ces différents domaines de liaison ont été détaillés dans de nombreuses publications faisant la synthèse de la littérature (14-16).

Sites de liaison formés par les domaines transmembranaires

Les sites de liaison des petites molécules, telles les amines biogéniques, qui activent les RCPGs de la famille 1, sont contenus dans une poche formée par les hélices transmembranaires. Ce domaine peut être profondément enfoui au cœur du récepteur, comme il a été démontré pour le récepteur β 2-adrénergique (17). L'utilisation des techniques de biologie moléculaire a mis en évidence que, pour la plupart des petites molécules agonistes, la poche de liaison se situe dans une cavité formée par les domaines transmembranaires III, IV, V, VI et VII. De façon similaire, dans le cas de la rhodopsine, le rétinol possède un site de liaison formé par les hélices transmembranaires. Ce ligand a tout de même la particularité d'être fixé de façon covalente à l'intérieur de son récepteur.

Sites de liaison formés conjointement par les domaines transmembranaires et les parties extracellulaires

Contrairement au schéma général décrit pour les petites molécules, les études du site de liaison de nombreux récepteurs de peptides ont démontré l'implication critique des domaines extracellulaires. En effet, le domaine de liaison de la majorité de ces récepteurs met en jeu des résidus situés au niveau de l'extrémité N-terminale et des boucles extracellulaires, mais également au niveau de la partie supérieure des domaines transmembranaires. Les sites de liaison les mieux caractérisés sont, entre autres, ceux des récepteurs neurokinines NK-1, de la substance P, de la cholécystokinine, de l'endothéline, ou encore de l'angiotensine II (AT1).

Sites de liaison formés par les domaines extracellulaires

La grande taille des hormones glycoprotéiques FSH (hormone folliculostimulante), LH (hormone lutéinisante) ou TSH (thyrotropine) (30-40 kDa) ne leur permet pas de pénétrer à l'intérieur de la cavité formée par les domaines

transmembranaires. La liaison de ces ligands des RCPGs de la famille 1 se fait par l'intermédiaire des régions extracellulaires des récepteurs. Ces hormones se lient initialement à l'extrémité N-terminale du récepteur, puis des changements conformationnels entraînent d'autres contacts avec les boucles extracellulaires. Parmi les récepteurs de la famille 1 faisant intervenir les domaines extracellulaires au cours de la liaison du ligand, ceux activés par des protéases, comme le récepteur de la thrombine, possèdent un mode de liaison particulier. En effet, la thrombine se lie au segment N-terminal extracellulaire de son récepteur, clive ce segment, et la courte extrémité N-terminale restante joue finalement le rôle d'agoniste du récepteur en allant interagir avec les boucles extracellulaires.

Sites de liaison formés par le domaine N-terminal

L'implication de la partie N-terminale des RCPGs dans le site de liaison des ligands est également très spécifique des récepteurs de la famille 2 et 3. Leur longue extrémité N-terminale semble en effet jouer un rôle clef dans la liaison de la plupart des ligands, incluant le VIP, le PACAP, le glucagon ou encore la calcitonine. La liaison de ces ligands nécessite également l'implication de boucles extracellulaires. Le processus de liaison sur les récepteurs de la famille 2 serait en fait séquentiel. Il impliquerait dans un premier temps des interactions avec l'extrémité N-terminale du récepteur, puis permettrait ensuite à une partie du ligand d'aller interagir plus en profondeur, avec les domaines transmembranaires du récepteur, pour induire l'activation.

1.1.5 Structure tridimensionnelle des RCPGs

Si la structure globale commune à tous les RCPGs est aujourd'hui parfaitement reconnue comme étant sept hélices transmembranaires reliées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires, la structure au niveau atomique, quant à elle, n'est toujours pas clairement déterminée. En effet, à l'exception de celle de la rhodopsine, la structure 3D précise des RCPGs est inconnue. L'analyse structurale de haute résolution des RCPGs est encore actuellement confrontée à un obstacle majeur: la dénaturation des RCPGs lorsqu'ils sont isolés de leur environnement lipidique. De plus, la faible abondance naturelle de ces récepteurs et la difficulté de produire et de purifier des quantités significatives de protéines recombinantes, freinent davantage la détermination de leur structure 3D par l'utilisation de techniques expérimentales comme la cristallisation.

Modèle de la bactériorhodopsine -vs- rhodopsine

Pendant de nombreuses années, la seule structure 3D disponible d'une protéine à 7TM a été celle de la bactériorhodopsine. Cette structure, obtenue par cryomicroscopie électronique, fut publiée en 1990 par Hendendon et ses collaborateurs (18). La bactériorhodopsine est une protéine membranaire retrouvée chez les bactéries halophiles qui agit comme une pompe à protons. Elle forme un complexe 1:1 avec un chromophore lié par covalence, le rétinol. Dans le complexe bactériorhodopsine/rétinal, le rétinol forme une base de Schiff avec la fonction amine de la lysine 216 du TM7 (19-21). Les premiers modèles de RCPG de la famille 1 ont été construits grâce à la technique de modélisation par homologie, en prenant la structure des hélices transmembranaires de la bactériorhodopsine comme gabarit (18, 22). Tous les modèles dérivés de la structure de la bactériorhodopsine présentent une organisation des domaines TM-I à TM-VII allant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre lorsqu'ils sont vus à partir du milieu extracellulaire. Il est cependant important de noter que même si la modélisation moléculaire s'est longtemps appuyée sur la bactériorhodopsine comme protéine de base, celle-ci n'est pas un récepteur couplé à une protéine G et de plus, elle ne présente qu'une

faible homologie de séquence avec les RCPGs (inférieure à 20 %) (18). De ce fait, un fort degré de variabilité existe entre les différents alignements de la bactériorhodopsine et des RCPGs qui ont été utilisés au cours de la construction des modèles, aboutissant à un empaiquetage différent des TMs dans ces modèles. Pour un même RCPG, différents modèles ont donc souvent été proposés. Ce sont les similitudes entre la bactériorhodopsine et les opsines, des RCPGs de la famille 1, qui ont conduit à considérer la bactériorhodopsine comme un modèle possible pour les RCPGs (famille 1). Cependant, la rhodopsine est le premier RCPG à avoir été cloné, et ce, chez l'homme. Cette protéine membranaire impliquée dans la vision nocturne est un RCPG un peu particulier étant donné que le récepteur est associé à son ligand. Dans la rhodopsine, de façon similaire à la bactériorhodopsine, le 11-cis-rétinal est associée de manière covalente à un résidu de lysine du TM-VII de la rhodopsine par la formation d'une base de Schiff voisin des opsines. La modélisation par homologie a évolué grâce aux données obtenues par cryomicroscopie sur la rhodopsine bovine et la rhodopsine de grenouille, effectuée à des résolutions de 9Å et 6Å respectivement. Puis en 1997, Baldwin a proposé un modèle définissant la position des carbones α au sein des hélices transmembranaires des RCPGs appartenant à la famille de la rhodopsine (2, 23, 24). Actuellement, la structure cristalline de la bactériorhodopsine est disponible à une résolution de 1.55 Å (25). La figure 5 représente la carte de la densité électronique de la rhodopsine en comparaison à la bactériorhodopsine dans une membrane lipidique (3). Cette étude représente la seule caractérisation disponible à ce jour dans la littérature de la structure d'un RCPG. On ne connaît donc que l'organisation des sept hélices transmembranaires les unes par rapport aux autres, mais l'on ne sait rien des régions intracellulaires et extracellulaires.

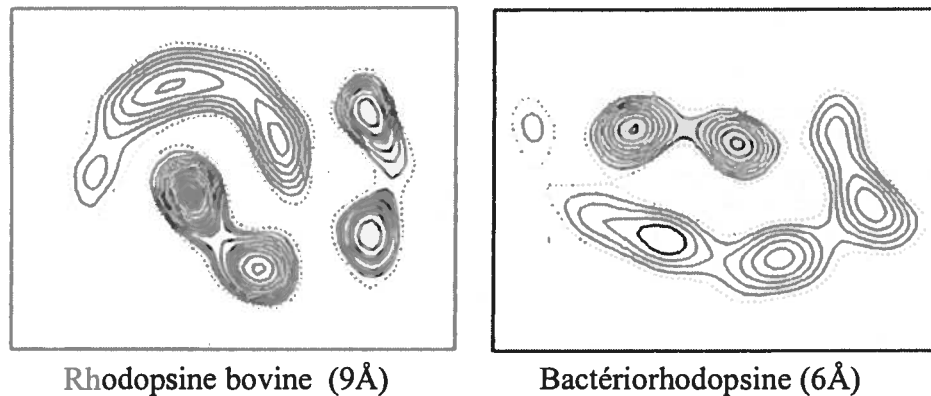


Figure 5. Densité électronique de la rhodopsine bovine et de la bactériorhodopsine dans une membrane lipidique.

La projection de la densité électronique est montrée sous le même nombre de niveau de contour et sous la même échelle. (D'après Schertler et al. 1995 (3)).

Révolution pour le modèle de la rhodopsine

Grâce à la cristallisation du premier RCPG, en 2000, de nouvelles opportunités d'études de la structure 3D de ces récepteurs ont été apportées (26). L'obtention de la structure à haute résolution de la rhodopsine a également permis de comparer les données issues de cette structure nouvellement disponible, avec les données structurales indirectes qui avaient été obtenues au cours des précédentes études. Le gabarit de RCPG construit par Baldwin en 1993, basé sur l'analyse de centaines de séquences de RCPG et corrélant avec de nombreuses données issues de la mutagenèse, s'est avéré être en accord avec la structure du cristal de la rhodopsine. Les premiers mécanismes détaillés, concernant l'activation de la rhodopsine qui est à l'origine de la transmission du signal, ont ainsi pu être rapportés (27, 28). La cristallisation de la rhodopsine a entraîné une importante évolution de la modélisation par homologie, puisqu'elle a permis pour la première fois l'utilisation d'un véritable RCPG comme gabarit afin de modéliser d'autres récepteurs appartenant à cette même famille. Très vite, le modèle établie pour la rhodopsine a été utilisé pour interpréter les données issues d'études de type structure/fonction pour différents récepteurs (29, 30). La bactériorhodopsine n'étant pas un RCPG, la rhodopsine

les modèles 3D de RCPGs sont donc préférentiellement construits par homologie avec l'une des structures cristallines de la rhodopsine bovine (26, 31, 32). Ces structures correspondent à des conformations de la rhodopsine dans son état inactif, à une résolution de 2.6 à 2.8 Å.

Validité du modèle de la rhodopsine comme gabarit pour tous les RCPGs

Cependant, si la structure désormais disponible d'un RCPG peut permettre de construire des modèles plus réalistes et donc plus adaptés à l'interprétation des données expérimentales, des doutes subsistent quant à la validité des modèles construits par cette approche. En effet, la rhodopsine est un RCPG très particulier. C'est un récepteur de lumière ayant un agoniste inverse comme ligand, le 11-cis-rétinal. Ce dernier est lié par covalence à son récepteur et c'est l'isomérisation induite par un photon du 11-cis-rétinal en trans-rétinal qui entraîne l'activation de la rhodopsine. Le mécanisme d'activation diffère donc de celui des autres RCPGs, pour lesquels la protéine est activée par l'arrivée d'un ligand agoniste. De plus, la rhodopsine ne présente pas une forte homologie avec les autres RCPGs. Par conséquent, la rhodopsine pourrait ne pas être un modèle systématiquement adapté à tous les RCPGs pour prédire de façon directe et efficace leur structure. Le fait que les structures cristallines disponibles de la rhodopsine correspondent à un état inactif de la protéine pose également le problème de la pertinence de ces modèles pour étudier les mécanismes de liaison des ligands. Les travaux de modélisation moléculaire de RCPGs, basés sur l'homologie avec le modèle bactériorhodopsine ou rhodopsine, suggèrent que le gabarit le plus adapté n'est pas toujours celui de la rhodopsine, mais semble plutôt dépendre du récepteur à l'étude. En effet, les études réalisées sur le récepteur D2 de la dopamine, le récepteur muscarinique M1, ou encore le récepteur H4 de l'histamine, montrent que la structure de la rhodopsine constitue un bon modèle pour ces récepteurs (29, 30, 33). Toutefois, les résultats sont différents avec le récepteur 5-HT2B, car dans ce cas la bactériorhodopsine semble être le gabarit le plus adapté pour modéliser la structure spécifique de ce récepteur (34). D'autres modèles utilisant la bactériorhodopsine se sont d'ailleurs montrés en cohérence avec les données d'études de type structure/activité de ligands connus pour un récepteur ciblé. C'est le cas des modèles du récepteur AT1 de l'angiotensine II et du récepteur de chémokine CCR2b

(35, 36). Ainsi, l'utilisation des techniques de modélisation par homologie a rencontré un véritable succès dans la construction de modèles moléculaires de certains RCPGs. L'exactitude de la prédiction repose cependant lourdement sur les structures utilisées comme modèle et sur leur homologie avec la protéine d'intérêt.

1.1.6 Outils pour l'étude structurale des RCPGs.

Modélisation par homologie

Dans ce contexte, les techniques de modélisation moléculaire par homologie constituent un moyen alternatif de première importance pour obtenir des informations sur la structure des RCPGs. Les méthodes de modélisation moléculaire par homologie reposent essentiellement sur un alignement correct entre la séquence primaire du récepteur à modéliser et celle du gabarit. Les domaines transmembranaires sont ainsi construits sur la base de l'homologie topologique des deux protéines, ce qui est évidemment facilité par la présence d'un bon degré d'homologie et d'un bon nombre de résidus conservés pour permettre un alignement correct des domaines transmembranaires. Cependant, la construction des boucles intra et extracellulaires est plus difficile à réaliser en raison de l'absence d'un modèle spécifique, de résidus laissant une signature caractéristique et d'une grande variabilité des séquences au niveau de ces domaines structuraux. Puisqu'un objectif majeur de la modélisation des RCPGs est de décrire les sites de liaison des ligands, les approches par homologie apparaissent, à elles seules, limitées dans leur capacité à prédire les structures des poches dans lesquelles les différentes variétés de ligands vont pouvoir venir se fixer. De nouvelles approches pour l'amélioration de ces modèles ont ainsi été recherchées.

Modélisation de domaines structuraux par RMN

L'élucidation de la structure tridimensionnelle de protéines membranaires telles que les protéines à sept passages transmembranaires demeure encore un défi majeur. En effet, en raison de leur taille, une analyse par RMN devient rapidement très complexe. De plus, leur hydrophobicité empêche généralement la production des cristaux nécessaires pour des analyses par diffraction. Cependant, il a été démontré que les RCPGs peuvent être modélisés par RMN en les étudiant plutôt par domaine structural. En effet, des peptides correspondant à des domaines structuraux de RCPGs (segments transmembranaires et boucles) peuvent adopter en solution une structure secondaire similaire à celle observée dans la protéine native (structure préalablement obtenue par cristallographie). Ceci propose donc que la structure des boucles et des hélices transmembranaires soit dominée et stabilisée par des interactions à courte distance. De plus, des études additionnelles ont démontré que la structure secondaire des segments transmembranaires et des boucles intra- et extracellulaires est induite et stabilisée principalement par des interactions à courte portée telles ($i \rightarrow i + 4$) pour un segment transmembranaire hélicoïdal ou encore ($i \rightarrow i + 1, i \rightarrow i + 2, i \rightarrow i + 3$ et $i \rightarrow i + 4$) dans le cas d'une boucle (37). Ainsi, ce phénomène suppose que la structure de la protéine native correspond en fait à la somme des structures individuelles des domaines la composant.

Application de la modélisation de domaines structuraux à la rhodopsine

La caractérisation de la structure de la rhodopsine par cristallographie a contribué à l'avancement global des recherches portant sur l'étude structurale des récepteurs appartenant aux protéines à 7TM. En effet, la rhodopsine est l'une des rares protéines dont la structure a été entièrement élucidée et sert de référence pour développer de nouveaux outils informatiques destinés à la modélisation, mais également pour valider de nouvelles méthodes spectroscopiques. En effet, l'équipe de Yeagle a analysé par RMN des fragments peptidiques de la rhodopsine représentant les boucles (38) et a comparé les structures obtenues à la structure cristalline de la rhodopsine précédemment déterminée par l'équipe de Henderson (2). L'équipe de Yeagle a ainsi observé que les arrangements moléculaires des fragments en solution évalués par RMN correspondaient aux structures

trouvées par cristallographie dans la protéine native (Figure 6). Une série d'études ont démontré que la structure en solution, déterminée par RMN, de fragments correspondant aux TMs possédait également une forte similitude à la conformation cristalline de la rhodopsine (39-41). Enfin, l'ensemble des études structurales par RMN a permis de reconstruire entièrement la structure de la rhodopsine (Figure 7) (37). Encore une fois, ces études proposent que l'ensemble de la structure d'une protéine membranaire possédant 7TMs est stabilisé par des interactions de courte distance dictées par la séquence primaire locale. De plus, cette structure serait maintenue en solution. Par conséquent, la modélisation par domaine structural est une alternative intéressante à la cristallographie. D'ailleurs, elle a été employée pour étudier le récepteur de phéromone chez *Saccharomyces cerevisiae* (42), le récepteur opiacé kappa (43), le récepteur du thromboxane A2 (44), le récepteur de la cholécystokinine A (45), et le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (46).

Application de la modélisation de domaines structuraux à la myohémérythrine

La modélisation par segments de protéine ne se limite pas à l'étude structurale des RCPGs possédant 7TMs. En effet, la validité de cette approche a été démontrée avec d'autres protéines dont la myohémérythrine, un transporteur d'oxygène chez les invertébrés marins, qui ne possède que 4 segments transmembranaires. Tout comme pour la rhodopsine, la structure de ces domaines structuraux établie par RMN (47) a été comparée à la structure cristallographique (48) (Figure 8) et il a été conclu que les segments peptidiques correspondant au domaine structural adoptent en solution la même structure que celle observée en cristallographie. Cette méthode dépasse donc l'étude structurale des récepteurs à 7TMs et semblerait être applicable à l'étude des protéines membranaires en général.

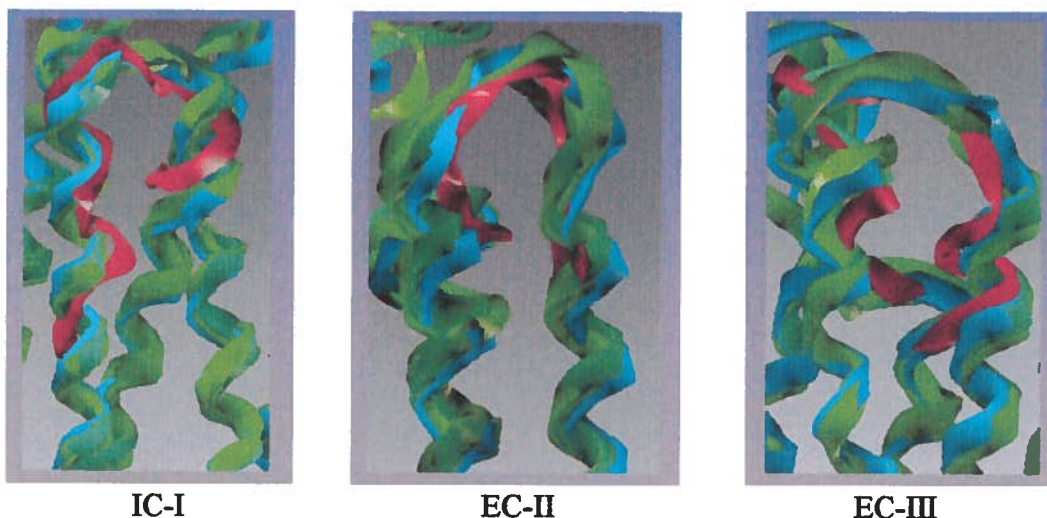


Figure 6. Comparaison de la structure de la boucle intracellulaire (EC-I) et des boucles extracellulaires-II et -III (EC-II et EC-III) de la bactériorhodopsine obtenue par RMN et par cristallographie.

Pour chaque segment peptidique (90-112, 119-133 et 177-200), quatre structures cristallographiques sont présentées (en vert et bleu). La structure des boucles déterminées par RMN (en rouge) a été superposée et comparée aux structures cristallines correspondantes. La superposition démontre que la structure en solution des domaines structuraux ressemble de près aux structures correspondantes observées dans la protéine intacte. (Tirée de Katragadda et al., 2000, (38))

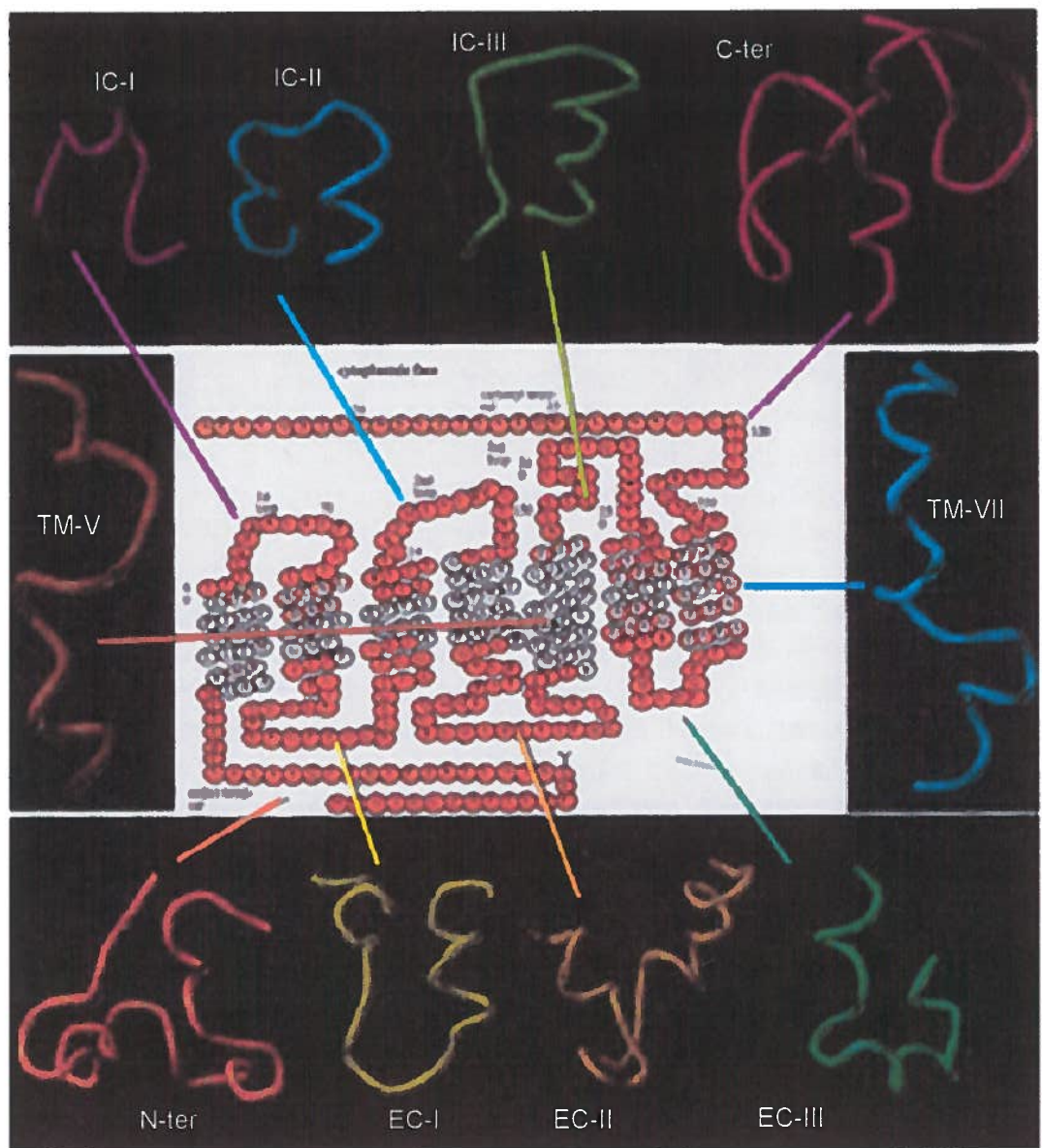


Figure 7. Caractérisation de la structure par RMN de fragments peptidiques en solution correspondant aux domaines structuraux de la rhodopsine.

La structure des peptides représentant les domaines structuraux de la rhodopsine démontre la même structure secondaire en solution (par RMN) que celle retrouvée dans la structure de la protéine native. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la structure d'un récepteur peut être caractérisée en réalisant la sommation des structures individuelles des domaines structuraux. (Tirée de Albert et Yeagle, 2000, (49)).

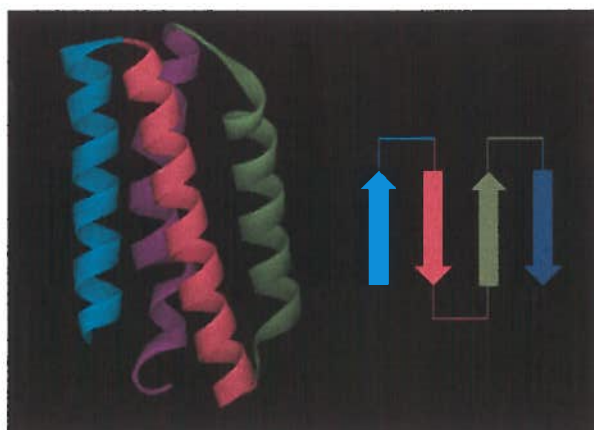


Figure 8 Structure tridimensionnelle de la myohémérythrine obtenue par cristallographie à une résolution de 1.8 Å (1A7D.pdb).

La structure de la myohémérythrine présente quatre domaines transmembranaires adoptant une conformation compacte en hélice- α .

1.1.7 Intérêts thérapeutiques des RCPGs

Le décryptage du génome humain a permis d'isoler plus de mille RCPGs depuis le clonage de deux de ces récepteurs, la rhodopsine bovine (5), suivi quelques années plus tard par le récepteur β 2-adrénergique (6). La grande diversité des RCPGs et le grand nombre de protéines-G sont à la base de la régulation de divers processus physiologiques. C'est en majeure partie ce qui explique que cette classe de récepteurs est la plus ciblée dans la recherche de nouveaux médicaments. Les RCPGs sont visés par plus de 60% cent des agents thérapeutiques actuellement utilisés. Grâce aux diverses recherches, le nombre de RCPGs connus ne cessent de croître. L'intérêt thérapeutique que pourraient présenter des agonistes inverses et des antagonistes de ces récepteurs, génère un enthousiasme particulier pour l'étude de leurs mécanismes d'activation. Comprendre le mécanisme d'activation de ces récepteurs représente donc un objectif important qui permettrait d'élucider leur participation dans les processus cellulaires associés, surtout si ces derniers sont liés à une pathophysiologie. Enfin, l'identification de ligands pour les RCPGs «orphelins» et de leurs fonctions pourrait permettre de trouver de nouveaux traitements.

1.1.8 Addendum: le récepteur β_2 -adrénergique

Contexte

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la plus grande famille de molécules présentes à la surface des cellules et sont impliqués dans la transmission des signaux au niveau intracellulaire. Comprendre comment les RCPGs fonctionnent fait l'objet d'intenses recherches depuis plus de 20 ans (1). La connaissance structurale des RCPGs a connu un essor remarquable en 2000 suite à l'élucidation de la structure cristalline de l'état inactif de la rhodopsine (2). Celle-ci a constitué la seule structure cristalline à haute résolution qui ait été rapportée d'un RCPG. Cependant, depuis la rédaction du manuscrit de cette thèse, la connaissance structurale des RCPGs a connu un second essor avec la caractérisation récente de la structure cristalline du récepteur β_2 -adrénergique (3-5), un RCPG canonique de la famille 1 (6). Le récepteur β_2 -adrénergique est connu pour lier l'épinéphrine (adrénaline) et la norépinéphrine (noradrénaline) qui ont une action régulatrice sur les fonctions cardiovasculaires et pulmonaires. L'addition de cette section complémentaire au manuscrit de thèse a pour objectif de présenter toutes nouvelles informations structurales qu'apportent la structure cristalline du récepteur β_2 -adrénergique sur la connaissance structurale des RCPGs et notre compréhension des mécanismes de liaison et de signalisation.

Stratégie

À la suite de plusieurs tentatives pour cristalliser le récepteur β_2 -adrénergique dans sa forme native (β_2 -AR), d'autres méthodologies ont dû être employées pour limiter l'hétérogénéité conformationnelle. En effet, différentes stratégies de cristallisation et/ou modifications du β_2 -AR ont dû être apportées incluant dans une première étape la co-cristallisation avec le carazolol (un agoniste partiel inverse¹) et le retrait du segment C-terminal flexible, suivi dans une seconde étape de la liaison au fragment Fab d'un

¹ Le carazolol est défini comme un agoniste partiel inverse puisqu'il réduit seulement 50% de l'activité basale du β_2 -AR

anticorps (7) ou le remplacement de la boucle intracellulaire-III (IC-III) par une protéine globulaire, le lysozyme T4 (β_2 -AR-T4L). La présence du carazolol a conféré au β_2 -AR-T4L une résistance aux pH extrêmes et à la température. Différemment, la boucle intracellulaire-III (IC-III) a été identifiée comme étant l'une des raisons des échecs due à une mauvaise stabilité structurale. Le remplacement de ce domaine par le lysozyme T4 (T4L) qui possède une structure bien ordonnée (8) a contribué à une meilleure rigidité et a facilité la nucléation. La croissance des cristaux dans un environnement micellaire (bicelle) et leurs analyses ont fait appel à des techniques avancées en cristallographie ayant nécessité l'exploration de plus de 15 000 conditions expérimentales (3). Ces modifications ont permis d'obtenir la structure cristalline à faible résolution (3.4 Å) du complexe β_2 -AR-carazolol lié au Fab due partiellement à la faible résolution du Fab (5). Malheureusement, la structure des boucles extracellulaires ainsi que celle du carazolol n'ont pu être déterminées à partir du complexe β_2 -AR-Fab ce qui limite l'interprétation de ce modèle. Cependant, un second complexe a été caractérisé à haute résolution (2.4 Å) soit le β_2 -AR-T4L-carazolol où le carazolol est présent ainsi que l'ensemble du récepteur (3) (Figure 9). Une description plus détaillée est présentée ci-dessous.

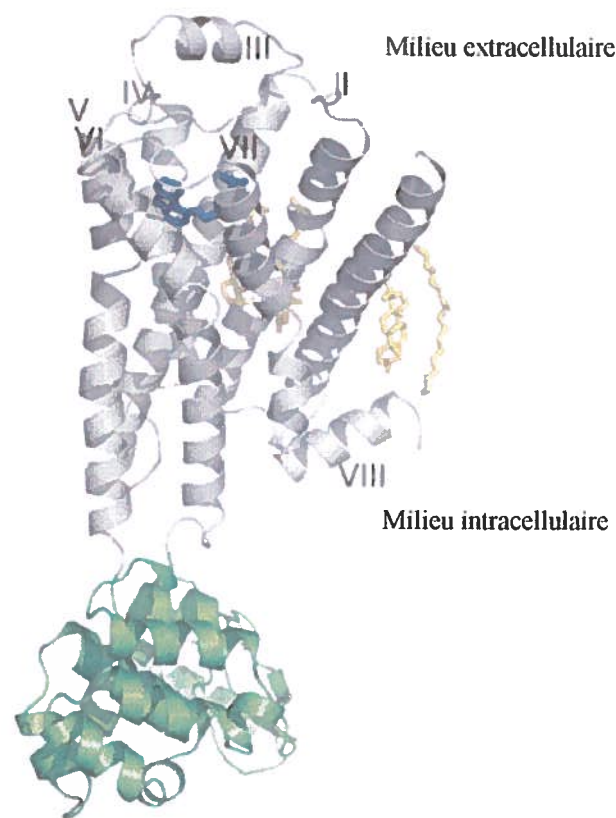


Figure 9. Structure cristalline à haute résolution du complexe β_2 -AR-T4L lié au carazolol

La figure présente le récepteur β_2 -AR (en gris), le domaine IC-III remplacé par la protéine globulaire lysozyme T4 (en vert), le site de liaison en bleu et quelques molécules lipidiques (en jaune). Seuls les TMs sont numérotés pour une meilleure clarté. (Tirée de Cherevoz et al., 2007,(3))

Récepteur fonctionnel ?

L'ingénierie moléculaire utilisée sur le récepteur β_2 -adrénergique (β_2 -AR-T4L) (3) peut avoir altéré les propriétés structurales et pharmacologiques du récepteur. Afin de vérifier l'impact des modifications, une étude fonctionnelle complète a été réalisée avec le β_2 -AR-T4L (4). Le récepteur β_2 -AR-T4L a présenté lors de tests de liaison et de compétition des propriétés pharmacologiques similaires au récepteur natif. En fait, le récepteur β_2 -AR-T4L a présenté une affinité légèrement plus élevée pour des agonistes comparativement à la forme native. Ainsi, à l'exemption de IC-III, le récepteur β_2 -AR-T4L reflète probablement la forme native du récepteur. De plus, il a été démontré que le β_2 -AR-T4L est reconnu par un anticorps «Fab» qui lie un épitope conformationnel du β_2 -AR (7) suggérant que β_2 -AR et β_2 -AR-T4L présentent une conformation similaire à la forme native fonctionnelle.

Structures cristallines du complexe β_2 -AR/carazolol/Fab et β_2 -AR-T4L/carazolol

De façon générale, les structures obtenues pour β_2 -AR ressemblent à la topologie observée pour la rhodopsine avec la présence de segments hélicoïdaux transmembranaires entourant le site de liaison. Au niveau du site de liaison, le carazolol est positionné profondément à l'intérieur des domaines transmembranaires (TMs), en accord avec le site de liaison du rétinol dans la rhodopsine. Quelques chaînes latérales situées dans le site de liaison du carazolol sont également retrouvées dans l'environnement du rétinol. Une étude de mutagenèse dirigée pourrait permettre de préciser le rôle de ces résidus dans la reconnaissance du ligand et la propagation du signal. Il a été démontré que la boucle extracellulaires-II (EC-II) dans β_2 -AR-T4L adopte une conformation hélicoïdale qui est en contact direct avec le carazolol (Figure 10) (3, 7). Cette particularité structurale n'est pas observée chez la rhodopsine. Les études de Cherezov et al. et Rosenbaum et al. suggèrent que cette structure de EC-II est importante pour la reconnaissance du ligand et la sélectivité (3, 4). La structure cristalline du β_2 -AR-T4L liée au carazolol apporte de nouvelles données sur le mécanisme de liaison des agonistes inverses et des changements conformationnels nécessaires pour accommoder les agonistes.

Les pharmacophores du site de liaison de β_2 -AR-T4L impliqués dans l'interaction avec le carazolol sont conservés dans le β_1 -AR. Différemment, la majorité des résidus non-conservés entre β_1 -AR et β_2 -AR se situent au niveau des boucles intra- et extracellulaires. Ainsi, les boucles extracellulaires pourraient occuper un rôle important dans la sélectivité des ligands de β_1 -AR et β_2 -AR puisque ceux-ci présentent des affinités différentes pour certains ligands tels que le bétaxolol et le ICI-118,551 (9). Cette hypothèse est renforcée par l'analyse de la structure qui a permis de constater que les boucles extracellulaires adoptent une conformation ouverte formant un site de liaison composé en partie par les boucles et les domaines transmembranaires-III, -IV, et -V et -VII. Cependant, il est possible que la liaison avec d'autres ligands résulte en un réarrangement et une conformation distincte du site de liaison.

La structure de la séquence conservée E/DRY (71% pour la famille A des RCPGs) au niveau du C-terminal du TM-III de β_2 -AR-T4L et β_2 -AR-Fab est différente que celle retrouvée dans la structure de la rhodopsine. Cette séquence est suspectée de former un lien ionique «*ionic lock*» qui a pour fonction de stabiliser la rhodopsine, le β_2 -AR et d'autres récepteurs dans leur conformation inactive (10). Ceci pourrait potentiellement expliquer le niveau d'activité basale plus élevée observé pour β_2 -AR-T4L comparativement à β_2 -AR.

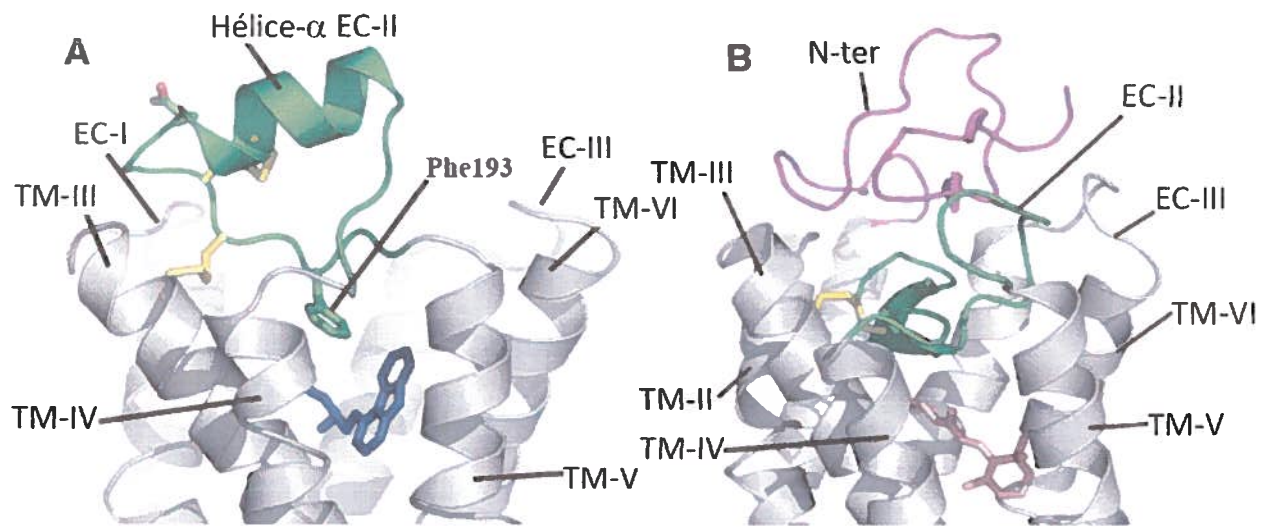


Figure 10. Comparaison de la face extracellulaire du β_2 AR-T4L et de la rhodopsine.

A) Le domaine N-terminal est absent de la densité électronique de la structure du β_2 -AR-T4L. EC-II (en vert) contient une courte hélice- α et deux ponts disulfures (jaune). Le second pont disulfure relie EC-II au TM-III. Il y a une interaction entre le EC-II et le carazolol (bleu) via Phe193. La boucle EC-II entière est tenue au-dessus du site de liaison supporté par les TMs et stabilisée par les ponts disulfures. B) Au contraire, EC-II (vert) dans la rhodopsine occupe une position plus basse dans la structure couvrant l'accès du site de liaison occupé par le rétinol (rose). EC-II adopte dans la rhodopsine un petit feuillet- β en combinaison avec le N-terminal (mauve). (Tirée de Cherevoz et al., 2007,(3)).

Conclusion

La caractérisation de la structure fonctionnelle du récepteur β_2 -adrénergique peut avoir d'importantes conséquences pour le développement d'outils pharmacologiques basés sur le «*structure-based drug design*». En effet, ceux-ci étaient jusqu'à présent basés uniquement sur les modèles par homologie construits à partir de la rhodopsine. En effet, la structure du récepteur β_2 -adrénergique procure maintenant une vue sur la structure d'un complexe agoniste inverse/RCPG. L'activation de la rhodopsine impliquant l'isomérisation cis/trans du rétinol est très différente du mécanisme d'activation du β_2 -AR qui implique la liaison d'une hormone. Ainsi, le β_2 -AR pourrait devenir le nouveau prototype de RCPG et conduire à des modèles plus précis. Toutefois, la connaissance structurale d'un complexe agoniste/RCPG lié à une protéine G est souhaitable pour une meilleure compréhension du mécanisme d'activation et de signalisation. Ceci constitue l'un des prochains grands défis technologiques et scientifiques.

Références (addendum)

- (1) Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., and Seuwen, K. (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1, 761-782.
- (2) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- (3) Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., and Stevens, R. C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.
- (4) Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Yao, X. J., Weis, W. I., Stevens, R. C., and Kobilka, B. K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266-1273.
- (5) Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.
- (6) Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272.
- (7) Day, P. W., Rasmussen, S. G., Parnot, C., Fung, J. J., Masood, A., Kobilka, T. S., Yao, X. J., Choi, H. J., Weis, W. I., Rohrer, D. K., and Kobilka, B. K. (2007) A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* 4, 927-929.
- (8) Zhang, X. J., Wozniak, J. A., and Matthews, B. W. (1995) Protein flexibility and adaptability seen in 25 crystal forms of T4 lysozyme. *J Mol Biol* 250, 527-552.
- (9) Frielle, T., Daniel, K. W., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988) Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9494-9498.
- (10) Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., and Javitch, J. A. (2001) Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem* 276, 29171-29177.

1.2: Le système urotensinergique

1.2.1 L'urotensine-II

La découverte de l'urotensine-II

L'urophyse, un organe caudal situé dans la région postérieure de la moelle épinière des poissons téléostéens, est particulièrement reconnue pour sa grande vascularisation et sa richesse en cellules neurosécrétrices. Les axones non-myélinisés des neurones (cellules de Dahlgren) sont projetés dans l'urophyse formant ainsi un système neurohumoral pouvant libérer plusieurs facteurs dans la circulation sanguine périphérique. Ces facteurs ont été classés en sous-groupes et nommés selon leur action biologique. L'urotensine-I, le premier peptide caractérisé à partir de l'urophyse, ciblait tout agent hypotenseur agissant sur les mammifères, l'urotensine-II identifiait tout agent constricteur sur les muscles lisses de poissons, l'urotensine-III définissait toute molécule capable d'induire un mouvement de Na⁺, et finalement, le terme urotensine-IV désignait une substance comportant une activité hydro-osmotique (50). En 1980, une étude sur l'urophyse de gobie (*Gillichthys mirabilis*), un poisson de petite taille, a conduit à l'identification d'un nouveau peptide cyclique: H-Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Cys-Val-OH (51). Ce neuropeptide a été nommé urotensine-II ou U-II compte tenu de son action vasoconstrictrice sur le système vasculaire du poisson. Depuis sa découverte chez le gobie, U-II a été identifiée chez la carpe (52) et d'autres espèces de poissons (53). Par la suite, U-II a été identifiée dans les motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière chez quelques batraciens (54) et mammifères dont la souris et le rat (55). L'isoforme humaine (H-Glu-Thr-Pro-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val-OH) a été décrite pour la première fois par Coulouarn *et al.* en 1998 (54).

Caractérisation de la structure primaire

À ce jour, la structure primaire de l'U-II a été caractérisée chez de nombreuses espèces de vertébrés. La séquence de l'U-II de souris (U-II) (55) et de l'U-II humaine (54) déduite à partir de l'ADNc serait la plus longue et la plus courte des formes connues à ce jour avec respectivement 17 et 11 résidus d'acides aminés.

Les isoformes d'U-II sont caractérisés par la présence d'un pont disulfure formant un domaine hexapeptidique cyclique ([Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]) localisé à l'extrémité C-terminale et un domaine linéaire en N-terminal. Le domaine cyclique ainsi que sa séquence sont conservés chez toutes les espèces, du poisson à l'homme, et ce malgré tout le processus évolutif. Par conséquent, il est probable que ce segment joue un rôle essentiel dans l'activité biologique de U-II. De plus, le cycle hexapeptidique est toujours précédé d'un résidu acide (Asp/Glu) et suivi d'un résidu hydrophobe (Val/Ile) en fonction de l'isoforme. À l'inverse, contrairement au domaine hexapeptidique cyclique, le domaine N-terminal diverge considérablement notamment chez les mammifères (Tableau 1).

Tableau 1. Séquences de U-II chez différents mammifères.

Homme							E	T	P	D	[C	F	W	K	Y	C]	V
Porc a						G	P	P	S	E	[C	F	W	K	Y	C]	V
Porc b						G	P	T	S	E	[C	F	W	K	Y	C]	V
Rat				pQ	H	G	A	A	P	E	[C	F	W	K	Y	C]	I
Souris	pQ	H	K	Q	H	G	A	A	P	E	[C	F	W	K	Y	C]	I
Singe							E	T	P	D	[C	F	W	K	Y	C]	V

Les résidus d'acides aminés en rouge correspondent à la signature conservée et les résidus en bleus sont des acides aminés possédant des propriétés similaires. La région N-terminale est une région hautement variable. Deux isoformes de U-II ont été identifiées chez le porc représenté par porc «a» et porc «b» (56). pQ: acide pyroglutamique.

Analogie avec la somatostatine

Lorsque l'urotensine-II a été pour la première fois caractérisée, plusieurs chercheurs ont immédiatement noté une similitude structurale avec la somatostatine (SST). Cette hormone est en fait un ensemble de peptides dérivant d'une séquence de 28 acides aminés qui a été élucidée en 1972 (57). La somatostatine biologiquement active est principalement constituée par un fragment de 14 acides aminés dérivant du peptide de 28 acides aminés (SANSNPAMAPRERKAGCKNFWKTFTRC). On parle donc de S14 ou S28 selon le cas. La somatostatine possède, tout comme U-II, une région hautement conservée à l'intérieur du cycle composée d'un motif «F-W-K» suivie d'un résidu hydroxylé, soit une thréonine ou une tyrosine. Cette similitude dans les caractéristiques structurales entre les deux peptides a été à la base du surnom «*somatostatin-like peptide*» pour U-II. De plus, l'alignement des séquences révèle que les deux cystéines de l'U-II sont superposables aux deux résidus F⁶ et F¹¹ de la somatostatine-14 lesquels sont capables, par des interactions électroniques, de mimer le pont disulfure de l'U-II (51). Il a été démontré que la stabilisation de cette interaction par l'établissement d'un lien covalent a conduit à l'analogue [C⁶, C¹¹]somatostatine-14 qui s'est révélé être plus puissant que la somatostatine quant à l'inhibition de la libération de glucagon, de GH et d'insuline (58). Des analogies de structure entre l'U-II et la somatostatine découlent de la désignation initiale de l'U-II comme un analogue naturel de la somatostatine. Cependant, l'homologie structurale entre l'urotensine-II et la somatostatine semble être le fruit du hasard (54) car tous deux affichent des actions biologiques différentes. En effet, la SST est un peptide multifonctionnel sécrété par l'hypothalamus qui exerce un contrôle inhibiteur sur la sécrétion de nombreuses hormones pancréatiques, intestinales et hypophysaires (59). Malgré le fait que la somatostatine est capable d'activer UT et possède un EC₅₀ 30 000 fois plus élevé que l'U-II, la SST (3000nM) ne semble pas posséder d'effets croisés avec l'U-II (0.1nM). Mais, indépendamment de l'origine de ces deux peptides, ces derniers possèdent des affinités structurales indéniables.

Précurseur de U-II

La totalité du précurseur humain de l'U-II peut être obtenue par clonage moléculaire à partir de la moelle humaine, un tissu très riche en ARNm (54). De même, la prépro-U-II a été clonée et caractérisée chez le rat (55) et le porc (56). Tout comme pour d'autres peptides vasoactifs, tels l'endothéline et la vasopressine, la forme mature et active de hU-II est dérivée d'un précurseur de bonne taille (Figure 11). En fait, deux précurseurs de hU-II ont été identifiés, soit un de 124 résidus d'acide aminé et un second de 139. Tous deux sont composés d'un peptide signal en N-terminal, suivi d'un propeptide et de la séquence U-II localisée en C-terminal. La différence entre ces deux isoformes se situe au niveau de la région du peptide signal (54) mais les deux précurseurs produisent, sous l'action de protéases, une forme unique et active de U-II. Le triplet KKR situé à la jonction du précurseur et de U-II constitue un site de clivage favorable à l'action protéolytique de convertases qui démontrent une forte affinité pour les sites composés d'acides aminés basiques comme Lys et Arg. Ce phénomène a été identifié et caractérisé, entre autres, pour le processus de maturation de la prosomatostatine (60).

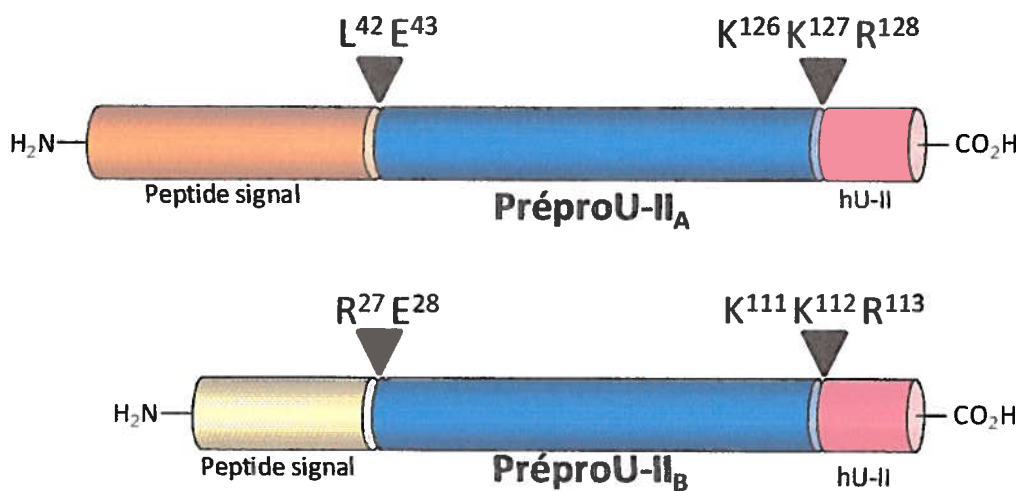


Figure 11. Précurseurs de hU-II: préproU-II_A et préproU-II_B.

Les sites de clivage sont représentés par ▼.

Distribution de l'ARNm de U-II

L'ARNm de hU-II est distribué dans tout l'organisme et touche plus de 50 tissus humains tels que le rein, le foie, la prostate et plusieurs glandes endocrines: surrénale, thyroïde, pancréas et thymus (61, 62). U-II est, entre autres, présent au niveau des cardiomyocytes et des artères coronaires (61). Ces résultats alimentent l'hypothèse que U-II soit un médiateur important du système cardiovasculaire. De plus, U-II est fortement exprimée dans les motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral, ce qui laisse penser que le peptide pourrait également agir au niveau du système nerveux central. Cependant, U-II a été également détecté dans les reins et, à plus faible densité, dans des tissus centraux et périphériques tels que muscle squelettique, thalamus, gyrus occipital supérieur, substance noire et urètre (63). Ceci suggère incidemment que hU-II pourrait être impliquée dans des processus autres que le contrôle du tonus vasculaire.

Action biologique de U-II

U-II est un peptide considéré comme une neurohormone puisqu'il est libéré, suite à une stimulation des neurones peptidergiques, dans le système vasculaire. Cette neurohormone semble de prime abord destinée au contrôle du système cardiovasculaire car U-II est, à ce jour, la molécule vasoconstrictrice la plus puissante (64). Les travaux effectués chez les poissons ont permis de dresser une liste exhaustive des effets biologiques de l'U-II. Cependant, U-II est actuellement reconnue pour sa puissante action vasoconstrictrice de l'artère pulmonaire étant en fait quatre fois plus puissante que ET-1, un peptide réputé pour sa force d'action (65). Malgré le fait que U-II provoque une forte vasoconstriction du système vasculaire chez le poisson, son activité biologique chez les mammifères dont le rat, le singe et l'humain demeure ambiguë. L'effet et l'intensité de la réponse à l'U-II sont parfois contradictoires et semblent dépendre de plusieurs facteurs dont l'espèce et l'origine du tissu étudié, de même que la nature in vivo ou in vitro de l'analyse biologique(66-68).

In vitro, U-II exerce un effet constricteur sur certaines artères de rat (61) et d'homme (65, 69) qui est 8 à 110 fois plus puissant que celui observé avec l'endothéline (70). Chez d'autres espèces tel que le chat et le porc, U-II provoque un effet

vasoconstricteur au niveau de plusieurs vaisseaux dont les aortes thoracique et abdominale ainsi que les artères pulmonaires. Chez les primates, l'inconstance des réponses biologiques de l'U-II a été notée; l'U-II provoque une vasoconstriction puissante sur diverses artères du macaque, contrairement à ce qui est observé chez le marmouset où le peptide n'a que très peu effet (64, 66).

In vivo, U-II a montré un effet vasodilatatoire lorsque injecté chez le rat conscient (71). Cette vasodilatation a été associée à la présence d'endothélium vasculaire. En effet, Gibson a observé lors de ses travaux qu'une vasodilatation se manifeste lorsque l'endothélium est conservé (72). De plus, in vivo, après une injection intra-péritonéale, U-II diminue la pression diastolique sans toutefois modifier la pression systolique systémique chez des rats anesthésiés. Au contraire, chez le singe anesthésié, un tel traitement entraîne une augmentation considérable de la tension artérielle (73). Enfin, chez l'homme, l'injection intradermique d'une faible dose d'U-II induit une vasoconstriction locale (74) alors que son infusion dans l'artère brachiale de volontaires sains produit soit un effet vasoconstricteur puissant (75) ou aucun effet (76). Face à ces données divergentes, il émerge que le rôle de l'U-II dans le contrôle de l'activité cardiovasculaire n'est pas formellement établi, même si des effets importants sont observés.

L'activité de U-II ne serait pas limitée au système cardiovasculaire, mais pourrait être impliquée dans le remodelage des tissus cardiaques (77), dans l'osmorégulation (78), dans la régulation des fonctions endocrines et métaboliques (79-81), et dans le comportement (82). Actuellement, plusieurs recherches sont en cours afin de préciser le rôle biologique de U-II chez l'homme. Toutefois, il est certain que U-II est un important médiateur du système vasculaire humain (vasodilatation et/ou vasoconstriction).

L'urotensin-II related peptide (URP)

En cherchant à caractériser la forme mature d'U-II de rats, Sugo *et coll.* ont isolé à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'U-II de gobie un peptide de huit acides aminés. Présentant un fort degré d'homologie de séquence à l'U-II (6 résidus identiques), ce peptide fut nommé urotensin II-related peptide ou URP (83). L'URP peut lier et activer le récepteur UT tout comme U-II. Ces résultats suggèrent que l'URP est un ligand endogène et fonctionnel du récepteur UT (84). La séquence de l'URP (H-Ala-[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH) est conservée chez la souris, le rat et l'homme (83). La séquence à l'intérieur du cycle hexapeptidique est identique à celle retrouvée pour U-II et serait à l'origine de l'activité biologique. Cependant, le résidu adjacent au cycle du côté N-terminal diffère entre les deux peptides (Asp/Glu pour U-II et Ala pour URP). Bien que les formes matures de l'U-II et de l'URP possèdent plusieurs acides aminés identiques, leurs précurseurs ne présentent que 23% d'homologie de séquence (83). Le gène de l'URP est fortement exprimé dans les motoneurones, comme celui de l'U-II, mais présente une expression tissulaire plus étendue au niveau du cœur. Ainsi, l'URP présente un profil d'expression similaire à celui de l'U-II et à ce jour au moins une activité biologique commune, la vasoconstriction.

1.2.2 Le récepteur de l'urotensine-II

La découverte et la caractérisation du récepteur UT

Bien que U-II soit connue chez les poissons depuis la fin des années 80, il a fallu attendre la fin des années 90 pour découvrir son récepteur. Une équipe américaine a montré, par une approche de pharmacologie inverse, que parmi 700 molécules potentiellement agonistes de RCPGs, seule l'U-II de gobie liait et activait un certain RCPG humain. Ce récepteur avait été identifié comme un récepteur «orphelin» dans le cadre du projet génome humain (85, 86). Cependant, le récepteur homologue chez le rat était connu depuis 1995 sous le nom de GPR14 (61, 85). L'union internationale de pharmacologie «*International Union of Pharmacology*» désigne de nos jours le récepteur de l'urotensine-II (GPR14) sous l'abréviation de UT (87).

Structure du récepteur de l'urotensine-II (UT)

UT appartient à la super famille 1 des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Chapitre 1). Ce récepteur membranaire composé de 389 résidus d'acide aminé est donc caractérisé par une topologie membranaire constituée de sept hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles hydrophiles extracellulaires et cytoplasmiques (Figure 12). La séquence d'UT varie selon l'espèce, mais les isoformes de singe et de rat sont les plus semblables à la forme humaine du récepteur (Tableau 2). De même que U-II partage des similitudes de structures avec la somatostatine, UT présente des similitudes avec le récepteur SST4 de la somatostatine. L'identité globale est de 27%, dont 41% au niveau des domaines transmembranaires. La séquence primaire de UT possède une grande similitude avec d'autres RCPGs humains dont les récepteurs opiacés ($\approx 25\%$ d'identité, 56% homologie (88)). UT est fonctionnellement couplé par l'intermédiaire d'une protéine Gq à la phospholipase C. La phospholipase C est une enzyme catalysant la réaction d'hydrolyse du PIP₂ (phosphatidyl inositol bis-phosphate) en IP₃ (inositol-triphosphate) et DAG (diacylglycérol). L'IP₃ est un messenger qui agit au niveau de récepteurs spécifiques, situés à la membrane de compartiments vésiculaires intracellulaires, entraînant un relargage à l'intérieur du cytosol, des ions calcium contenus

dans ces vésicules. Le DAG quant à lui active la protéine kinase C qui est capable de phosphoryler des protéines afin d'en moduler l'activité biologique.

Expression et distribution de UT

Le gène de UT présente une expression tissulaire assez large. L'expression de UT est principalement dans les tissus nerveux centraux et dans la moelle épinière (55). Cependant, UT est présent également dans le système cardiovasculaire, quoique en faible densité (64). Même si une plus faible densité de UT a été détectée au niveau des cellules musculaires lisses provenant de l'aorte, de l'artère coronaire, de l'oreillette, du ventricule et de certains lits vasculaires, la forte constriction des tissus cardiovasculaires par U-II peut être expliquée par sa très grande affinité pour son récepteur (K_d 0.3-6.0 nM et B_{max} 1-22 fmol/mg de protéine) (69). En effet, la liaison de U-II avec UT est décrite comme quasi-irréversible.

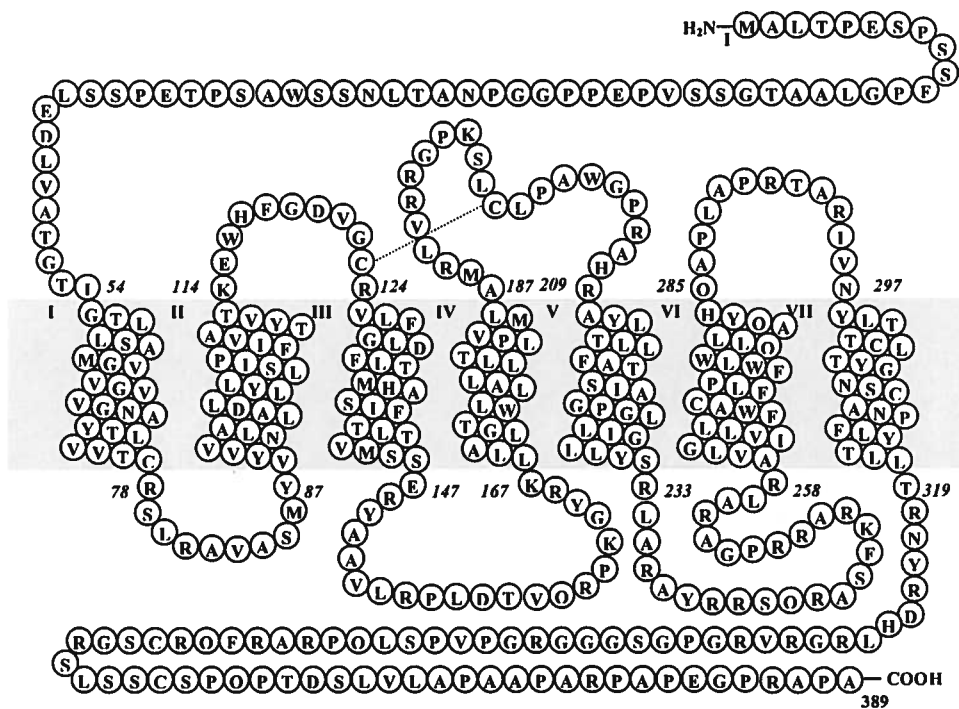


Figure 12. Structure du récepteur de l'urotensine-II humain (hUT)

Tableau 2. Identité de séquence pour quelques isoformes du récepteur UT

Souris	Humain	Singe	Rat	Chat	
	75	74	92	77	Souris
		95	74	74	Humain
			74	74	Singe
				77	Rat
					Chat

Valeurs en pourcentage.

1.2.3 Étude structurale de U-II et UT

L'objectif des études structurales sur U-II est d'identifier les éléments chimiques et structuraux impliqués dans sa liaison avec UT et/ou dans son activation. Actuellement, la structure primaire de U-II est bien caractérisée et plusieurs études de type structure-activité ont permis d'éclaircir le rôle de chacun des résidus dans la liaison avec UT et/ou dans son activation. La caractérisation par RMN de la structure de U-II et les résultats d'études de type structure-activité ont permis, entre autres, de mettre en évidence des éléments structuraux pouvant être à la base d'un mécanisme hypothétique de la liaison entre U-II et UT. Ces hypothèses sont d'ailleurs cohérentes avec des modèles tridimensionnels du complexe ligand-récepteur. Bien que théorique, ces modèles obtenus via la modélisation par homologie constituent un outil précieux pour mieux comprendre le mécanisme fonctionnel de ce système et élaborer de façon rationnelle de nouveaux ligands. En 2003 et 2007, une équipe de l'Université de Sherbrooke a identifié expérimentalement des résidus de UT potentiellement impliqués dans le site de liaison de U-II en utilisant la technique de marquage par photoaffinité (89, 90). À l'heure actuelle, ces résultats, ainsi que ceux présentés dans les articles publiés contenus dans cette thèse, constituent les seules études procurant des données expérimentales à l'échelle moléculaire sur le complexe U-II/UT. Les sections suivantes présentent un résumé des différentes études structurales portant sur U-II et son récepteur, ainsi que leurs principaux résultats.

Études de type structure-activité et Ala-Scan de U-II

Il existe peu de techniques afin d'identifier les pharmacophores des peptides, c'est-à-dire les résidus et les éléments physico-chimiques jouant un rôle clef pour l'activité biologique et la sélectivité. L'Ala-Scan consiste à remplacer à tour de rôle chacun des acides aminés par un résidu alanine et d'évaluer ensuite l'effet sur les propriétés biologiques du peptide. Les études de type structure-activité consistent à tronquer et/ou substituer des résidus par d'autres résidus présentant des éléments structuraux ou chimiques distincts afin, entre autres, d'identifier les portions d'un peptide responsable de l'activité. Cette technique a été utilisée pour U-II afin d'évaluer la

contribution du segment N-terminal du peptide dans la liaison et l'activation du récepteur et d'identifier la séquence minimale capable de maintenir l'activité biologique. Le retrait successif des acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale a montré que la délétion des quatre premiers résidus génère un agoniste complet de l'activité contractile de U-II sur l'aorte de rat, tandis que la perte de la totalité du segment N-terminal produit un agoniste partiel, c'est-à-dire une molécule moins efficace (91). Ainsi, la séquence minimale capable de maintenir l'activité biologique de l'hU-II est composée des résidus 4 à 11. Des tests pharmacologiques ont de plus montré la faible contribution de la portion N-terminale et le rôle essentiel du noyau cyclique pour l'activité de l'U-II (92). Il a été noté que la substitution à tour de rôle des acides aminés du segment N-terminal, soit les résidus Glu-Thr-Pro-Asp, par une alanine a peu ou pas d'impact sur l'activité biologique et sur l'affinité envers le récepteur. Ainsi, ces résidus ne participeraient pas à la formation d'une interaction avec le récepteur UT.

Contrairement au domaine N-terminal, le noyau cyclique de hU-II est crucial pour son activité. En effet, le fragment hexapeptidique cyclique de U-II est un analogue biologiquement actif ce qui démontre l'importance du pont disulfure et de cette région hautement conservée (54, 55). D'ailleurs, H-Asp⁴-[Cys⁵-Phe⁶-Trp⁷-Lys⁸-Tyr⁹-Cys¹⁰]-Val¹¹-OH est la séquence minimale capable de maintenir l'activité biologique de l'U-II. Une étude similaire effectuée sur l'URP a conclu également que la portion N-terminale du peptide n'avait pas une grande importance du point de vue de l'activité biologique (93). De plus, les résultats d'études de type structure-activité réalisées sur la somatostatine (Ala¹-Gly²-[Cys³-Lys⁴-Asn⁵-Phe⁶-Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Phe¹¹-Thr¹²-Ser¹³-Cys¹³]) sont similaires (94-97). En effet, le [Cys⁵-Phe⁶-D-Trp⁷-Lys⁸-Thr⁹-Cys¹⁰] (numérotation à partir de la somatostatine-14) est le plus petit analogue actif de la somatostatine et il contient la majorité des pharmacophores identifiés par l'Ala-Scan (98). Par conséquent, cette séquence cyclique semble être la portion biologiquement active de la somatostatine.

Les modifications apportées aux acides aminés endocycliques de hU-II ont eu un effet désastreux sur l'activité agoniste et l'affinité envers le récepteur (92, 93, 99-103).

Ainsi, il a été démontré que l'aromaticité est une caractéristique importante du noyau cyclique de l'U-II, car trois des quatre résidus endocycliques affichent cette propriété. Cependant, la présence de la fonction hydroxyle du résidu Tyr9 de l'hU-II n'est pas requise pour son activité (92). Il a été également démontré que la charge positive, la distance et la position du groupement chargé positivement sont des caractéristiques structurales cruciales de la Lys8 de l'hU-II. De plus, l'importance du résidu Lys8 est en accord avec l'hypothèse que U-II pourrait interagir avec un acide aspartique au niveau du TM-3 qui est positionné au centre de la structure du récepteur UT. Cette liaison est observée pour d'autres récepteurs dont ceux de la neurokinine (104), de l'endothéline (105-107) et de la somatostatine (58, 108). La position 11 de U-II, occupée par une valine, semble être un élément crucial à l'activité biologique. Sa substitution par une alanine ou sa délétion a entraîné une perte importante de l'activité agoniste et de l'affinité. Or, la valine n'est pas toujours conservée d'une espèce à l'autre. Toutefois, cette position est toujours occupée par un acide aminé hydrophobe, comme la valine ou l'isoleucine, dont les propriétés physico-chimiques sont très similaires. Par contre, il est possible de conclure que la fonction carboxylique libre de l'extrémité C-terminale n'est pas responsable de l'activité biologique ou de l'affinité, puisque l'amidation de cette fonction génère un analogue tout aussi puissant que la molécule mère.

Études de U-II par RMN

Les études structurales sont impératives afin de caractériser la géométrie spatiale des pharmacophores préalablement identifiés à l'aide d'études de type structure-fonction (92, 99, 101, 102, 109). Les structures de l'urotensine-II humaine et de poisson ont été étudiées par spectroscopie RMN et élucidées dans différents milieux: H₂O (99), diméthylsulfoxyde (110, 111), SDS (112). Ces études conformationnelles de U-II ont ainsi permis dans un premier temps de déterminer que la portion N-terminale du peptide présente un ensemble de conformations irrégulières. L'absence de structures secondaires spécifiques dans cette portion et la faible conservation des résidus à travers l'évolution dans ce segment renforcent l'hypothèse que cette séquence est accessoire à l'activité biologique. Contrairement au segment N-terminal, U-II possède une structure compacte et bien ordonnée dans sa région cyclique. Cette portion du peptide est caractérisée (Figure

13), entre autres, par un coude β de type II' qui est également présent dans la structure de la somatostatine (113-115). Il est nécessaire au maintien de l'activité biologique (116). La présence d'un pont disulfure, ainsi que la présence de trois acides aminés aromatiques parmi les quatre résidus endocycliques rigidifient le noyau cyclique ce qui limite le nombre de conformations tolérables en raison de l'encombrement stérique. Ces éléments structuraux permettent le repliement adéquat de la molécule et ainsi, stabilisent l'orientation des chaînes latérales des acides aminés. Il est à noter que pour la somatostatine, et ce de façon similaire, deux phénylalanines interagissent ensemble en superposant leur noyau aromatique et forment ainsi un cycle dont l'orientation des chaînes latérales est stabilisée. Dans la structure de U-II, les chaînes latérales respectives des résidus hydrophobes Phe, Trp et Val de la structure cyclique sont toutes orientées du même côté de la molécule formant ainsi un amas qui pourrait interagir avec un domaine hydrophobe du récepteur (101, 110). De plus, les chaînes latérales des acides aminés du segment WKY représentent des composantes chimiques cruciales, qui, dans une conformation adéquate, sont des prérequis à la liaison et l'activation du récepteur. Ces données ont permis de proposer un arrangement spatial précis des pharmacophores et ont conduit au développement d'un antagoniste non-peptidique de UT.



Figure 13. Squelette de carbone de l'U-II de gobie obtenu par RMN et minimisation moléculaire.

La figure présente la superposition des neuf meilleures structures de U-II déterminées par RMN en présence de DMSO basées sur la minimisation des énergies, les angles dièdres, la longueur des liens et les valeurs d'effet nucléaire Overhauser inférieures. La conformation de la région cyclique est ordonnée (résidus 6-11), contrairement à la région N-ter qui est désordonnée. (Tirée de Bhaskaran et al. 1994, (110)).

Études de photomarquage

Boucard et al., ont été les premiers en 2003 à publier des données expérimentales sur le complexe U-II/UT (89). Ils ont utilisé des analogues photosensibles de U-II contenant le p-benzoyl-L-phénylalanine (Bpa) pour cibler par photomarquage le site de liaison de U-II sur le récepteur UT de rat (rUT). Cette étude suggère une interaction entre la phénylalanine en position 6 de hU-II et les résidus Met184 et Met185 de rUT (correspondant à Met185 et Met188 pour l'isoforme humaine) présents dans le TM-IV (89). La substitution par génie moléculaire de ces méthionines par Leu (M184L/M185L) ou Ala (M184A/M185A) a résulté en une diminution majeure de la liaison de rU-II aux récepteurs mutants ce qui renforce l'hypothèse que les méthionines participent au site de liaison de U-II. Plus récemment, cette équipe a présenté de nouveaux résultats complémentaires (90). Cette étude démontre que les résidus en positions 1, 2, 3 et 4 du segment peptidique N-terminal de hU-II interagissent avec le résidu Met288 de la troisième boucle extracellulaire de rUT (Figure 14). Toujours utilisant la même méthode, ils ont substitué les positions 1 et 2 de la séquence [Pen5, trp7, Orn8]U-II qui correspond à l'urantide, un peptide généralement décrit comme un antagoniste compétitif de U-II, afin de comparer le site de liaison pour un agoniste vs un antagoniste. Tout comme les analogues photosensibles de U-II, ces substitutions n'ont pas affecté les propriétés pharmacologiques du peptide envers le récepteur UT. Les résultats ont montré que [Bpa1, Pen5, trp7, Orn8]U-II et [Bpa2, Pen5, trp7, Orn8]U-II interagissent avec le résidu Met288 de la troisième boucle extracellulaire de rUT (Figure 14). Ces travaux suggèrent donc que les agonistes et les antagonistes pourraient lier rUT en adoptant une géométrie similaire.

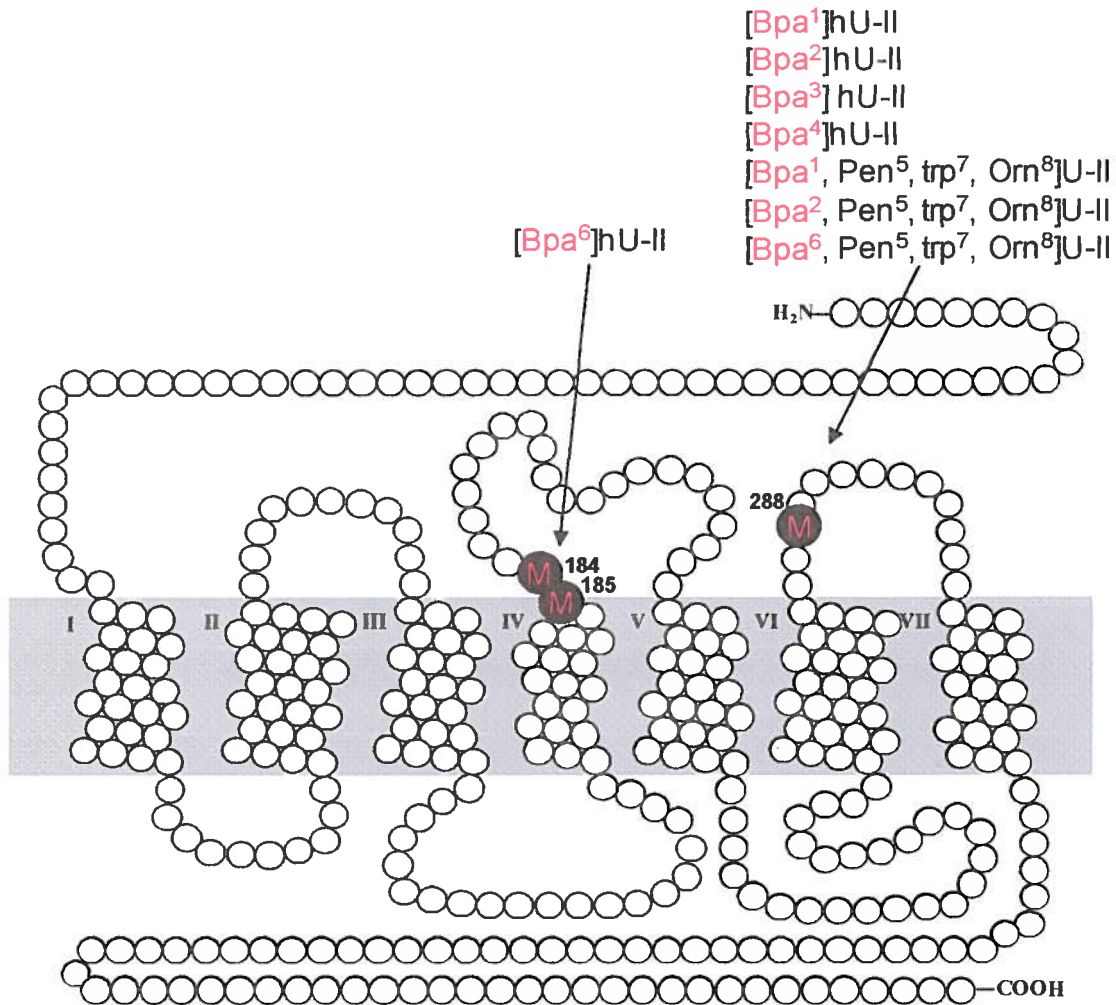


Figure 14. Identification par photomarquage des acides aminés du récepteur rUT impliqués dans le site de liaison de U-II et de l'urantide.

L'étude par photomarque a permis de mettre en évidence des points de contact entre des analogues photosensibles de U-II et certains résidus de rUT. (Adaptée de Boucard et al. 2003, (89) et Holleran et al. 2007, (90)).

2.3.5 Les modèles structuraux proposés du complexe U-II / UT

Un article publié en 2002 a proposé le premier modèle du complexe U-II-rUT (101). Ce modèle a été développé à partir du modèle existant pour le récepteur delta-opioïde (117) et de la structure résolue par cristallographie de la rhodopsine bovine (2.6Å) (pdb: 1F88) (26). Kinney et al., ont introduit comme contrainte principale une interaction électrostatique souvent observée entre les ligands et les RCPGs (118, 119), soit entre la lysine de U-II et l'acide aspartique-130 du TM-III de UT. Par la suite, les auteurs ont cherché à stabiliser le ligand en le positionnant de façon à minimiser l'encombrement avec les boucles extracellulaires. L'une des forces de ce modèle est que l'orientation des pharmacophores de U-II a été coordonnée avec celle des résidus voisins afin d'assurer une compatibilité au niveau du récepteur, lequel formerait une cavité hydrophobe autour du ligand. Cependant, ce modèle demeure très qualitatif puisqu'il n'a pas exploré toutes les possibilités d'encastrement et il ne tient pas compte, entre autres, des données structurales obtenues par photomarquage avec U-II.

Plus récemment, un autre modèle a été proposé en 2005, mais cette fois-ci avec hUT (120). Les domaines transmembranaires ont été modélisés à partir des données précédentes (hU-II/rUT) et de la rhodopsine bovine (26). Cependant, les boucles extracellulaires ont été modélisées en se basant sur l'homologie avec d'autres protéines (EC-I; pdb:1JTB), (EC-II; pdb:1BVP), (EC-III; pdb:1NAL). L'intérêt de cette étude réside surtout dans le fait que les auteurs ont évalué l'encastrement (docking) d'un ligand agoniste, le P5U, et d'un antagoniste non-peptidique. Tout d'abord, la structure du P5U a été résolue par RMN (111). Lors de l'élaboration du modèle, les auteurs ont ajouté manuellement un lien électrostatique avec le résidu Asp130 du récepteur. Leurs résultats montrent que le pont disulfure reliant TM-III à EC-II serait près du site de liaison, et même que la boucle couvrirait l'accès au site de liaison. En fait, le modèle obtenu implique la participation majoritaire des segments TM-V, TM-VI, TM-VII, EC-I, EC-II et EC-III lors de l'interaction du récepteur et du ligand. De plus, une poche hydrophobe est créée par His208 (EC-II), Leu212(TM-V), Trp277(TM-VI), Ala281(TM-VI), Gln285(EC-III) et Val296 (EC-III) autour du résidu Tyr9 du P5U. De même, des interactions hydrophobes ont été mises en évidence pour l'extrémité C-terminale du PU5

avec Val11 qui est emprisonnée dans une cavité hydrophobe composée de Phe131(TM-III), Val184(TM-IV), Ala207(EC-II), Tyr211(TM-V), Leu212(TM-V) et Leu215(TM-V). Certaines régions de hUT sont reconnues pour posséder plusieurs résidus hydrophobes pouvant participer dans une interaction impliquant le recouvrement d'orbitales π . Plus particulièrement, le cycle aromatique de Tyr9 est orienté de façon à former un recouvrement d'orbitales π avec le cycle aromatique de Trp227. D'ailleurs, le remplacement de Tyr9 par un résidu Phe dans U-II ne cause pas de perte d'activité biologique ce qui suggère que le groupement OH n'est pas à la base de l'interaction (101). De plus, la substitution de Tyr9 par Ala, provoque la perte de l'activité ce qui renforce l'hypothèse d'une interaction par recouvrement d'orbitales π . Par contraste, ce modèle propose de nombreuses liaisons hydrogènes importantes dont deux impliquant l'indole (NH) du Trp277 et le groupement CO des résidus Lys8 et Trp7 du P5U ; ces résultats sont en accord avec les résultats des études de type structure-activité (voir section 2.3.1). Un pont hydrogène serait également formé entre le OH de Tyr9 et le CO de Ala281 localisé au sein du squelette de la protéine. De même, le CO de Tyr298, toujours sur la chaîne d'acides aminés de la protéine, forme un pont hydrogène avec le NH de Trp7 du ligand. Cette dernière observation est en accord avec les résultats proposant que Trp7 interagisse avec le récepteur à l'aide d'une interaction polaire plutôt que hydrophobe. Le P5U, la chaîne latérale de Phe6 pointe vers l'extérieur du récepteur en direction de EC-I et de EC-II à proximité des résidus Gln53 et Val296. Quant au résidu Asp4, il tend à vouloir former des liaisons hydrogènes avec les domaines EC-II et EC-III dont le NH du Trp203(EC-II) et de Arg294 (EC-III). Enfin, deux autres liaisons sont proposées avec les CO de Pro201 et de Leu200 localisés dans le squelette de la protéine. Pour terminer, la charge négative en C-terminal établirait un pont salin avec le résidu Arg206 protoné situé dans le segment EC-II du récepteur.

Chapitre 2: Les articles

2.1 Article 1

2.1.1 Mise en contexte de l'article 1

L'une des thématiques du laboratoire est l'étude des propriétés moléculaires et pharmacologiques des peptides. Un effort tout particulier a été mené pour caractériser l'urotensine-II, un puissant peptide vasoconstricteur chez l'humain. Une étude de type structure-activité, conduite par un étudiant précédent, a permis d'identifier les pharmacophores de U-II. Ces travaux ont mené, en collaboration avec la compagnie Aventis, à l'élucidation de la structure tridimensionnelle de U-II, ainsi qu'à l'identification d'un antagoniste non-peptidique de U-II (99). Ces travaux ont contribué à l'énoncé d'une hypothèse décrivant le mécanisme de liaison de U-II à son récepteur UT. Parallèlement, certaines études ont proposé que U-II puisse être un important médiateur du tonus vasculaire et ainsi participer à l'étiologie de pathologies comme l'hypertension artérielle. Ainsi, il est devenu primordial de clarifier les mécanismes de liaison de U-II à son récepteur. En fait, une meilleure compréhension des déterminants chimiques et structuraux de UT essentiels à la liaison de U-II pourrait faciliter le développement d'outils pharmacologiques pour l'étude du système cardiovasculaire.

Ayant peu de données expérimentales disponibles dans la littérature sur la structure du complexe U-II/UT, nous avons proposé comme projet de thèse d'identifier et de caractériser la structure de domaines de UT susceptibles d'être impliqués dans la liaison d'agonistes et/ou d'antagonistes. Cette étude s'est donc inscrite dans le prolongement des travaux qui avaient été précédemment menés sur U-II au sein du laboratoire.

Dans le cadre du premier article, nous présentons une démarche expérimentale ayant pour but premier d'identifier des domaines structuraux du récepteur UT impliqués dans la liaison de U-II. En se basant sur les données disponibles dans la littérature sur U-II, UT et d'autres RCPGs, nous avons synthétisé 5 domaines structuraux d'UT soit les

domaines transmembranaires III et IV, ainsi que les trois boucles extracellulaires. Par la suite, nous avons évalué l'affinité de chacun de ces domaines pour U-II par résonance plasmonique de surface (RPS) et exploré leur structure secondaire par dichroïsme circulaire dans différents milieux.

Cet article présente, dans un premier temps, les résultats obtenus par RPS qui ont permis de suggérer la participation de la boucle extracellulaire-II et -III dans la liaison de U-II. Suite à ces résultats, nous avons jugé approprié de poursuivre les tests de liaison en utilisant d'autres ligands de UT dont l'agoniste URP et l'antagoniste compétitif Urantide. Cette étude complémentaire nous a permis de conclure que l'URP se lie à UT selon un mécanisme similaire à celui de U-II en interagissant avec les boucles extracellulaires-II et -III. Par contre, le résultat obtenu avec l'Urantide propose un mécanisme de liaison différent, impliquant uniquement le domaine extracellulaire-II. Nous présentons également les résultats obtenus suite à l'analyse de la conformation des domaines structuraux par dichroïsme circulaire dans différents milieux. Ces analyses ont été réalisées dans le but d'expliquer les différences de liaison observées par RPS. Elles se voulaient également une étape préparatoire en vue d'une caractérisation structurale complète par RMN. Ainsi, nous présentons dans cet article les détails et le choix des domaines synthétisés, les analyses d'interaction avec U-II, URP et Urantide par RPS, ainsi que les résultats de dichroïsme circulaire.

2.1.2 Contribution de l'étudiant à l'article 1

Le début du projet a consisté en une familiarisation avec les études structurales des récepteurs et à l'élaboration d'une méthodologie pertinente à nos activités. Tous les travaux de laboratoire ont été pilotés et largement effectués par moi-même. J'ai tout d'abord délimité les domaines structuraux de UT et ensuite synthétisé ceux représentant un intérêt particulier pour notre étude. En ce qui concerne la synthèse des peptides, le protocole de départ a été basé sur celui qui est déjà bien établi au laboratoire. Toutefois, quelques problèmes sont survenus, particulièrement pour la synthèse des domaines

transmembranaires, où j'ai été amené à modifier les protocoles. J'ai, entre autres, apporté des modifications chimiques aux domaines structuraux afin que ceux-ci puissent être suffisamment solubles en milieu aqueux et fixés par une interaction biotine/streptavidine à la puce pour l'étude par RPS. Au moment de débiter l'étude d'interactions entre les domaines structuraux et les ligands, la RPS était utilisée à l'Institut par une autre équipe de recherche pour mesurer des interactions protéine/protéine. Voulant utiliser les avantages que représente la RPS pour l'étude des interactions entre deux molécules, j'ai mis au point une méthode pour évaluer l'affinité des différents domaines structuraux de UT synthétiques envers différents ligands. De nombreuses mises au point et un remodelage du protocole ont été nécessaires afin d'appliquer cette technologie à l'étude d'interactions peptide/peptide. Néanmoins, j'ai été en mesure de fixer les domaines structuraux de UT de façon orientée à une puce et de mesurer leur affinité pour différents ligands par RPS. Le second volet de l'article a été de caractériser la structure secondaire des domaines de UT dans différents milieux par dichroïsme circulaire. Le développement des domaines structuraux et les tests de liaison ont été réalisés sous la direction du Pr Fournier, tandis que l'étude conformationnelle des peptides par CD a été effectuée sous la direction du Pr Davoust.

En ce qui concerne la contribution des autres auteurs de cet article, Dr Guilhaudis et Dr Milazzo m'ont conseillé et guidé dans l'analyse par CD. Ceci a été fait en collaboration avec Dr Oulyadi en prévision des analyses RMN à réaliser (second article). L'analyse et l'interprétation des résultats, ainsi que la rédaction de cet article ont été réalisées par moi-même dans un premier temps, revues et corrigées par mon directeur de thèse le Pr Fournier, en concertation avec tous les auteurs de cet article.

2.1.3 Résumé et copie de l'article 1

CHARACTERIZATION OF UROTENSIN-II RECEPTOR STRUCTURAL DOMAINS INVOLVED IN THE RECOGNITION OF U-II, URP AND URANTIDE.

*Stéphane Boivin, Laure Guilhaudis, Isabelle Ségalas-Milazzo, Hassan Oulyadi,
Daniel Davoust et Alain Fournier*

L'urotensine-II (U-II) et l'*urotensin-II-related peptide* (URP) sont deux puissants peptides vasoconstricteurs qui produisent leur action biologique via un récepteur couplé aux protéines G nommé UT. Ce récepteur est exprimé abondamment au niveau du système cardiovasculaire. Les effets de l'U-II et de l'URP peuvent être bloqués avec l'urantide, un antagoniste sélectif. Par conséquent, nous avons réalisé une étude ayant pour but de caractériser l'arrangement conformationnel des trois boucles extracellulaires, ainsi que des domaines transmembranaires III et IV. La structure secondaire des fragments synthétiques du récepteur a été déterminée par dichroïsme circulaire (CD) dans différents solvants et sous conditions micellaires. Les spectres démontrent que les fragments de récepteur, à l'exception de la boucle extracellulaire I, ont une propension à adopter une conformation en hélice- α . De plus, en utilisant la résonance plasmonique de surface (RPS), nous avons mesuré l'affinité de liaison des ligands, U-II, URP, et urantide envers les domaines extracellulaires de UT. Les résultats obtenus démontrent que les deux ligands, U-II et URP, lient les boucles extracellulaires II et III avec une affinité similaire, alors qu'aucune interaction n'a été observée avec la boucle extracellulaire I. De plus, la liaison de l'urantide a été observée uniquement avec la seconde boucle extracellulaire. Ces résultats suggèrent que U-II et URP, mais pas l'urantide, lient UT selon un mécanisme commun. La corrélation des résultats de CD et de ceux obtenus par RPS semble indiquer, entre autres, que l'adoption de la géométrie hélicoïdale des boucles extracellulaires II et III, pourrait favoriser la liaison des ligands.

Article publié dans: Biochemistry. 2006; vol. 45 (19), p:5993-6002.

Article 1

Characterization of Urotensin-II Receptor Structural Domains Involved in the Recognition of U-II, URP, and Urantide[†]

Stéphane Boivin,^{‡,§} Laure Guilhaudis,[§] Isabelle Milazzo,[§] Hassan Oulyadi,[§] Daniel Davoust,[§] and Alain Fournier^{*,‡}

Laboratoire d'Études Moléculaires et Pharmacologiques des Peptides (LEMPP), Institut National de la Recherche Scientifique, Université du Québec, INRS – Institut Armand-Frappier 245 boul. Hymus, Pointe-Claire (Montréal), QC, Canada, H1P 1G6, and Laboratoire de Chimie Organique et de Biologie Structurale, IFRMP 23, UMR 6014 CNRS, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Received January 28, 2006; Revised Manuscript Received March 22, 2006

ABSTRACT: Urotensin-II (U-II) and urotensin-II-related peptide (URP) are potent vasoconstrictors, and this action is mediated through a G protein-coupled receptor identified as UT. This receptor is expressed abundantly in the mammalian cardiovascular system, and the effects of U-II and URP can be blocked with urantide, a selective antagonist. Thus, we carried out a study with the aim to characterize the conformational arrangement of the three extracellular loops of UT as well as the transmembrane domains III and IV. Secondary structures of the synthetic receptor fragments were determined using circular dichroism (CD) spectroscopy in a variety of solvent and micelle conditions. Spectra showed that all receptor segments but not the extracellular loop I exhibited a propensity for adopting the α -helix folding. Furthermore, using surface plasmon resonance (SPR) technology, we measured the binding affinities of the ligands, U-II, URP, and urantide toward the UT extracellular segments. SPR data showed that both U-II and URP bind extracellular loops II and III with similar affinities, whereas none of these two ligands were able to interact with the extracellular loop I. Moreover, the binding of urantide was observed only with the second extracellular loop. These results imply that U-II and URP but not urantide would bind to UT according to a common pattern. Also, the correlation of the CD spectral information with the affinity data suggested that the adoption of a helical geometry in UT, by extracellular loops II and III, might be essential for favoring the binding of ligands.

Urotensin-II (U-II) is a cyclic undecapeptide (1) that was originally isolated from the goby urophysis (2). Nevertheless, isoforms of this peptide were also found in other species of fish (3) as well as in amphibians (4) and mammals (5). All U-II peptides share the common cyclic hexapeptide core -CFWKYC- that is structurally similar to the central region of somatostatin-14 (-FWKT-), a segment that is essential for biological activity (1, 6). The cyclic segment of the U-II isopeptides is always preceded by an acidic amino acid (Asp or Glu) and followed by a hydrophobic residue (Val or Ile). On the contrary, the N-terminal portion of all U-II isoforms is highly variable. Interestingly, a recent report described the isolation and structure elucidation of a novel rat peptide that shares the C-terminal amino acid sequence with human and rat U-II (ACFWKYCV). This peptide, now designated as a U-II-related peptide (URP¹), exhibits a high affinity toward the U-II receptor and shares the same biological actions with U-II.

The physiological role of U-II in the mammalian cardiovascular hemodynamics and vascular smooth muscle tone

control is still not fully understood (7). Furthermore, controversial data were even reported. Thus, biological observations indicated that actions of U-II are variable. As a matter of fact, they are influenced by the type of vascular beds and blood vessel size. Moreover, U-II effects are tissue- and species-dependent (7–9). For instance, vasoconstrictor responses were observed in the rat thoracic aorta, but vasodilating effects were detected in the rat coronaries. Nevertheless, despite the heterogeneity of vascular activities, knockout of the U-II receptor gene in mice gave rise to major vascular problems, thus confirming the key role of UT in vascular homeostasis and suggesting that U-II/UT might be involved in some cardiovascular pathologies such as hypertension (10).

High throughput screening showed that U-II was the endogenous ligand of an orphan receptor previously known

[†] Financial support was obtained from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Ministère de l'Éducation du Québec, and the Région de la Haute Normandie. S.B. receives a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (514) 630-8816. Fax: (514) 630-8850. E-mail: alain.fournier@iaf.inrs.ca.

[‡] Institut Armand-Frappier.

[§] Université de Rouen.

¹ Abbreviations: ACN, acetonitrile; BOP, benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate; CD, circular dichroism; CMC, critical micelle concentration; DIEA, diisopropylethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DPC, dodecylphosphocholine; equiv, equivalent; EC, extracellular loop; EDT, ethanedithiol; Fmoc, fluorenylmethoxycarbonyl; GPCR, G protein-coupled receptor; IIFIP, 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol; MRE, mean residue ellipticity; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption/ionization – time-of-flight spectroscopy; hUT, human urotensin II receptor; rUT, rat urotensin II receptor; SDS, sodium dodecyl sulfate; SPR, surface plasmon resonance; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol; TM, transmembrane domain; URP, Urotensin-II-related peptide.

as GPR14 (11, 12) and currently identified as UT. The human UT receptor (hUT) isoform was characterized and appeared to be a member of the large G protein-coupled receptor family that shares a seven transmembrane helix motif (11, 13). This receptor contains 389 residues and possesses two potential *N*-glycosylation sites in the *N*-terminal domain. It also exhibits one cysteine residue in the first and second extracellular loop that are postulated to participate in a disulfide bridge. Two cysteines are also present in the C-terminal stretch of UT, where they represent potential posttranslation sites for the addition of palmitate. This receptor shows some structural similarities with the somatostatin receptor/subtype 4 and some opioid receptors (13). It is predominantly expressed in cardiovascular tissues and the motor neurons of the spinal cord (11, 14).

Structure-activity relationship (SAR) studies (15–18) described the pharmacophoric requirements of the UT receptor. Hence, it was showed that the *N*-terminal segment of the U-II molecule is not essential for affinity and activity but that its cyclic structure plays a key role. Moreover, it was demonstrated that only the side chains of residues of U-II Trp⁷, Lys⁸, and Tyr⁹ are required for receptor recognition and activation (15, 16). Similar studies using goby urotensin-II identified the same pharmacophores and concluded that their precise spatial orientation is crucial for the interaction with the receptor (19). Also, other analyses of U-II using NMR spectroscopy (20) showed that the residues found in the core region probably adopt a highly ordered compact conformation with the formation, on one side of the molecule, of a hydrophobic cluster created by residues Phe⁷, Trp⁸, and Val¹². It was then postulated that this cluster may interact with a hydrophobic pocket located in the UT receptor (20). Additionally, the NMR analysis of URP together with Alascan data confirmed the importance of the triad Trp-Lys-Tyr as pharmacophores and pointed out that an inverse γ -turn is also intimately associated with the biological activity of this peptide (21).

Using molecular homology analysis, Kinney et al. proposed the first model of the interaction U-II-rUT in 2002 (19). They built a molecular complex in which the lysine residue of U-II was aligned toward the Asp¹³⁰ side chain of TM-III of UT. This structural arrangement allowed tight contacts between the receptor and the Trp, Lys, and Tyr side chains of U-II, which were found to be essential to obtain full agonist activity with the ligand. More recently, using a similar molecular homology method, Lavecchia et al. (22) published the 3D structure of a model of a peptidic or nonpeptidic U-II agonist-hUT complex. Their data gave information very similar to those of Kinney et al. on the putative ligand binding pocket. Photolabeling techniques provided further data on the nature of the interaction between U-II and its receptor. In point of fact, the Phe residue of U-II would be in the close vicinity of two methionines (Met¹³⁴ and Met¹³⁵) located in the fourth transmembrane domain of rat UT (23).

The full identification of the chemical and structural pharmacophoric requirements of UT is imperative to understand the binding and activation mechanisms involved in the formation of the U-II-UT molecular complex. Hence, in the present article, we describe a study aiming at characterizing the interaction between UT and three known ligands, that is, the agonists U-II and URP as well as the antagonist

urantide. This goal was attained by first analyzing, using surface plasmon resonance, the ability of the three ligands to interact with synthetic extracellular and transmembrane fragment domains of the U-II receptor and then, by correlating their affinity with their structural propensities determined with circular dichroism. Our results showed that (i) U-II and URP interact specifically with extracellular loops II and III of hUT according to a common pattern and that (ii) urantide is recognized only by extracellular loop II. Thus, SPR and CD studies revealed that the synthetic structural UT domains contained some of the conformational and chemical features essential for the binding of hU-II to hUT. Moreover, this work produced experimental evidence that the antagonist urantide exhibited a different binding mode to that of the agonists U-II and URP.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. All amino acid derivatives were obtained from ChemImpex International (Wood Dale, IL) or Matrix Innovation, Inc. (Montreal, QC), and the coupling reagent benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphate (BOP) was purchased from Matrix Innovation, Inc. (Montreal, QC). The solvents (ethanol, methanol, acetonitrile (ACN), dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM), and diethyl ether) were obtained from Fisher Scientific (Montreal, QC), whereas trifluoroacetic acid (TFA), phenol, ethanedithiol (EDT), and diisopropylethylamine (DIEA) were from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON). Dodecylphosphocholine (DPC) was purchased from C/D/N Isotopes, Inc. (Pointe-Claire, QC), and trifluoroethanol (TFE) as well as hexafluoro-2-propanol (HFIP) were from Carlo Erba-SDS (Peypin, FRA). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Fisher Scientific (Montreal, QC). All reagents for SPR detection were purchased from BIAcore (Uppsala, SWE), including the HBS-EP buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% (v/v) surfactant P20) and sensor chips SA. The dPEG₄-biotin acid was obtained from Quanta BioDesign (Powell, OH), urotensin-II-related peptide (URP) from Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Belmont, CA), and urantide from Peptides International (Louisville, KY). Bradykinin, angiotensin II, neuropeptide Y (NPY), and IRL-1620 were synthesized in our laboratory.

Determination of the Urotensin II Receptor (UT) Topology. Two different methods, the Kyte and Doolittle hydrophathy analysis plots (24) and the shareware HMMTOP v2.0 (25), were used to predict, from the primary sequence of UT (SwissProt; Q9UKP6), the location of its structural domains, such as the extracellular loops and the transmembrane helices.

Secondary Structure Prediction. The prediction of secondary structure and the determination of helicity per residue were performed using the AGADIR program (26). AGADIR is a prediction algorithm based on the helix/coil transition theory, which predicts the helical behavior of monomeric peptides. Calculations were performed at pH 7 and 298 K. A minimum percentage of 0.5% helicity/residue was considered to predict the presence of a helix. For EC-I, predictions were also performed using the PHD algorithm (27), which predicts the secondary structure (α -helix, β -strand) of proteins.

Table 1: Description of the Synthetic UT Fragments

domain	peptides	sequences ^a
EC-I	UT(110–127)	<i>TYVTKEWHFGDVGCRVLF</i>
EC-II	UT(182–212)	<i>LPVMLAMRLVRRGPKSLCLPAWGPRAIIR</i> <u>4YL</u>
EC-III	UT(281–300)	<i>AQYHQAPLAPRTARIVNYLT</i>
TM-III	UT(119–146)	<i>GDVGCRVLFGLDFLTMH</i> <u>ASIFTLTMSS</u>
TM-IV	UT(168–194)	<i>LLALGTWLLALLLTLPV</i> <u>MLAMRLVRRG</u>
bEC-I	biotin-(PEG) ₄ -UT(110–127)	biotin-(PEG) ₄ - <i>TYVTKEWHFGDVGCRVLF</i>
bEC-II	biotin-(PEG) ₄ -UT(182–212)	biotin-(PEG) ₄ - <i>LPVMLAMRLVRRGPKSLCLPAWGPRAIIR</i> <u>4YL</u>
bEC-III	biotin-(PEG) ₄ -UT(281–300)	biotin-(PEG) ₄ - <i>AQYHQAPLAPRTARIVNYLT</i>
bTM-III	biotin-(PEG) ₄ -UT(119–146)	biotin-(PEG) ₄ - <i>GDVGCRVLFGLDFLTMH</i> <u>ASIFTLTMSS</u>
bTM-IV	biotin-(PEG) ₄ -UT(168–194)	biotin-(PEG) ₄ - <i>LLALGTWLLALLLTLPV</i> <u>MLAMRLVRRG</u>

^a Italic and underlined residues indicate the position of the putative transmembrane domain.

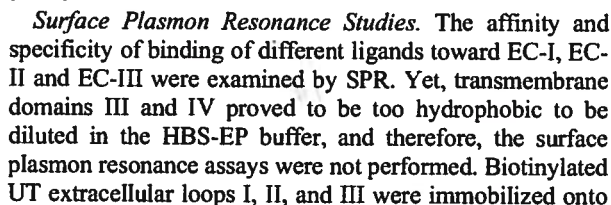
Peptide Synthesis and Cleavage. U-II and five UT fragments, corresponding to the three UT extracellular loops (EC) and transmembrane domains (TM) III and IV, were synthesized. UT peptide fragments were identified as follows: UT(110–127) or EC-I, UT(182–212) or EC-II, UT(281–300) or EC-III, UT(119–146) or TM-III, and UT(168–194) or TM-IV (Table 1). A solid-phase strategy combined with Fmoc chemistry methodology was used. Briefly, all peptides were assembled using a semiautomatic multireactor system. The Wang resin was used as the solid support, and the amino acids of the peptide sequences were introduced under their Fmoc-N-protected form (3 equiv). Couplings were performed in DMF in the presence of DIEA (5 equiv), and BOP (3 equiv) was the coupling reagent. Deprotection was achieved with 40% piperidine in DMF. The peptides were deprotected and cleaved from the solid support using TFA containing a mixture of ethanedithiol, phenol, and water as scavengers (92:2.5:3:2.5). The reaction was carried out for 60 min at 0 °C. Then, the solution was filtered, and the resin was washed with an equal volume of TFA. After evaporation of TFA, the remaining oily material was precipitated with diethyl ether and collected on a fritted-glass funnel. The crude material was dried under vacuum and stored at –20 °C until purification.

Peptide Modifications for SPR Study. A small amount of each peptide-resin was modified at the N-terminus by introducing dPEG₄-biotin acid as a building block. The coupling was achieved with BOP reagent in the presence of DIEA. Deprotection and cleavage of the N-biotinylated-peptide-resin were obtained as described above.

Peptide Purification and Characterization. U-II was obtained following the previously published procedure (15). EC-I, EC-II, EC-III, and their related biotinylated peptides were dissolved in 10% ACN in aqueous TFA (0.2%) and purified with a RP-HPLC system (Waters PrepLC500A) equipped with a model 441 absorbance detector and a Flanged MODCol FMB-1030 (250 × 21.2 mm) column packed with Phenomenex Jupiter C₁₈ (300 Å, 15 μm). Flow rate was maintained at 20 mL min^{–1} and detection was at 230 nm. Peptides were eluted with a 10–50% linear gradient of ACN (10%) in aqueous TFA (0.2%). For TM-III and TM-IV, the column was rather packed with a C₄ support (300 Å, 5 μm), and the peptides were purified with a 40–80% linear gradient of ACN in aqueous TFA (0.2%) at a flow rate of 40 mL min^{–1}. Homogeneous fractions, as established using analytical HPLC, were pooled and lyophilized. Peptide molecular weight was verified using MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE, ABI, Foster City, CA), and purity was confirmed with analytical HPLC.

Immobilization of Biotinylated Peptides for SPR. Assessments of the ligand binding to UT domains were performed using a BIAcore 2000 instrument (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) equipped with a SA sensor chip (Biacore, Inc.). SA sensor chips were coated with streptavidin and covalently immobilized onto a carboxymethylated dextran matrix. HBS-EP was used as the running buffer. According to the manufacturer's procedure, the SA chip was conditioned with three consecutive injections of 1 M NaCl in 50 mM NaOH, at a flow rate of 100 μL min^{–1}, before the immobilization of the UT fragments. Thereafter, a solution of each biotinylated-PEG₄-UT fragment, obtained by dissolving the material in the running buffer at a concentration of 100 μM, was circulated over the conditioned SA-chip. SPR assays with the biotinylated-PEG₄-UT transmembrane domains III and IV were not carried out because these peptides were poorly soluble in HBS-EP buffer. Thus, immobilization of the three biotinylated extracellular loop domains was individually performed on the SA-chip by circulating the solution at a flow rate of 10 μL min^{–1} for 5 min. The procedure was repeated three times to favor a high density of biotinylated-UT loops on the SA-chip, and each step was accompanied with a pulse of 1 M NaCl in 10 mM NaOH at a flow rate of 50 μL min^{–1}. All experiments were performed at 25 °C, and an injection of bovine serum albumin (0.1 mg mL^{–1}), at a flow rate of 5 μL min^{–1}, was used to determine nonspecific binding.

SPR Affinity Assays. Seven peptide solutions were prepared in the HBS-EP buffer, at concentrations ranging from 16 to 718 μM, to rank their binding efficacy to the extracellular domains of UT. Among these seven ligands, three are known to bind the whole UT receptor, that is, U-II (agonist), URP (agonist), and urantide (antagonist). The four other peptides, that is, bradykinin, angiotensin II, NPY, and IRL-1620 are ligands known to bind GPCRs other than UT, and they were used as controls to determine the selectivity and specificity of binding to the UT synthetic domains. All peptides were circulated onto each UT domain immobilized on the sensor chip SA for 300 s at a flow rate of 5 μL min^{–1}, followed by a 200 s dissociation phase. Regeneration of the biotinylated-UT-SA-chip surface was achieved using a short injection of 50 mM NaOH at a flow rate of 50 μL min^{–1}. Each concentration was analyzed in triplicate, and a separate flow cell, on which only biotin had been immobilized, was used as a blank to estimate the nonspecific binding to the carboxymethylated dextran chip. The K_D value of each peptide ligand was calculated with the BIAevaluation ver. 3.2 software.



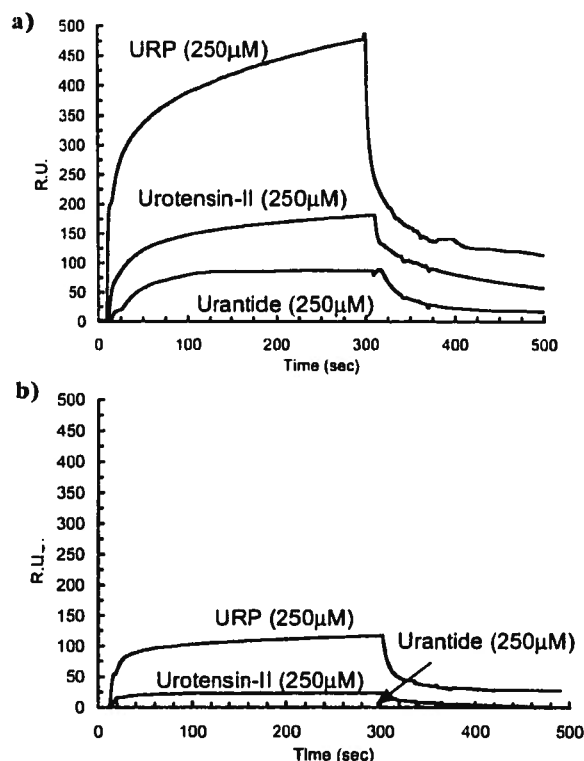


FIGURE 2: Surface plasmon resonance binding assays of U-II, URP, and urantide toward some structural domains of UT, (a) biotin-PEG₄-EC-II and (b) biotin-PEG₄-EC-III. U-II, URP, and urantide did not interact with the biotin-PEG₄-EC-I domain, and urantide did not interact with the biotin-PEG₄-EC-III domain. The lines that represent the responses of control peptides are superimposed on the baseline (angiotensin II, NPY, bradykinin, and IRL-1620).

an SA-chip by means of a strong biotin-streptavidine interaction. A high association rate combined with a low dissociation process resulted in a rapid and abundant UT domain immobilization, as shown by the strength of the SPR signal (≈ 1100 RU). Two agonists (U-II and URP) and one antagonist (urantide) known to bind the UT receptor were circulated over each extracellular loop domain of UT immobilized on the SA-chip, and SPR data showed that U-II, URP, and urantide interacted with some domains of UT. Hence, Figure 2a shows that U-II and URP bind to extracellular loops II and III, whereas Figure 2b demonstrates that urantide binds only to extracellular loop II. None of these three peptides interacted with extracellular loop I. In fact, the results showed that among the three ligands, URP exhibited the largest binding response on EC-II and was also more potent than U-II on EC-III. Binding on EC-II and EC-III was concentration-dependent and was rapidly reaching an equilibrium that was followed by a fast dissociation step at the end of injection. The dissociation constant (K_D) was analyzed with the BIAevaluation v.2 software from Biacore. As shown in Table 2, the peptides showed similar affinities for the EC-II and EC-III domains. Thus, U-II showed an affinity of 7.60×10^{-6} M for EC-II and 9.75×10^{-6} M for EC-III, and URP gave affinities of 1.42×10^{-6} M and 8.54×10^{-6} M for EC-II and EC-III, respectively, and finally, urantide exhibited an affinity of 2.76×10^{-6} M toward EC-II. To assess the specificity of these binding responses, four control peptides (bradykinin, angiotensin II, NPY, and IRL-1620) were evaluated in the SPR assays carried out with the

Table 2: Affinities of U-II, URP, and Urantide toward Some UT Domains, as Determined by SPR

	EC-I K_D	EC-II K_D	EC-III K_D
U-II	n.a. ^a	7.60×10^{-6} M	9.75×10^{-6} M
URP	n.a.	1.42×10^{-6} M	8.54×10^{-6} M
urantide	n.a.	2.76×10^{-6} M	n.a.

^a n.a.: not applicable.

structural UT domains. None of these peptides exhibited binding to EC-I, EC-II, EC-III, or the nonsubstituted surface. These results strongly suggested that the interaction of U-II, URP, and urantide with EC-II as well as that of U-II and URP with EC-III is specific.

Helix Structure Prediction. UT peptide sequences were submitted to the prediction program AGADIR. For the extracellular loops, no helical content was predicted for EC-I, whereas a strong helicity was proposed for the segments 183–193 and 205–210 of EC-II, and a moderate helicity was predicted between residues Pro²⁹⁰ and Tyr²⁹⁸ of EC-III. An analysis of the UT transmembrane domains with AGADIR suggested a highly stable helix for portions 123–127 and 131–138 of TM-III and 171–192 of TM-IV, respectively.

Structural Studies Using Circular Dichroism. The overall CD spectrum of a given peptide/protein represents the combination of the individual spectra of each secondary structure found in the molecule. Therefore, we used CD to investigate the secondary structure content of extracellular domains I, II, and III as well as that of transmembrane domain IV of UT. CD measurements of the UT segments were carried out in a variety of media such as phosphate buffer, organic solvents (MeOH, TFE or HFIP)/buffer mixtures, and solutions containing cell membrane-mimetic micelles (SDS and DPC). A complete CD evaluation of the various domains, in all media, was not possible because of the lack of sufficient solubility that is sometimes observed with the peptides. Nonetheless, as shown in Figure 3, a set of CD data was recorded for all peptides in either stabilizing conditions.

Hence, in the phosphate buffer, EC-I showed a low solubility, but so far, its CD spectrum suggested a predominant random-coil conformation in that condition. However, upon the addition of 30% HFIP to the buffer, EC-I solubility improved, and its CD spectrum then exhibited a pattern related to a β -sheet structure, as characterized by a negative band at 218 nm and a positive signal at 196 nm. A rise of HFIP concentration from 30 to 80% led to a further stabilization of the partially folded β -sheet, as shown by a marked increase of the Cotton effect (Figure 3a). Similar conformational data were obtained in neat MeOH. Deconvolution of these spectra with DICHROPROT gave an estimate of 3% α -helix and 56% β -sheet. CD results are in accordance with PHD, which predicted a β -strand for segments 2–9 and 13–17.

The CD spectra of EC-II in phosphate buffer, displayed patterns similar to those of EC-I in the same condition. Consequently, EC-II, which is also poorly soluble, gave a CD spectrum lacking any of the features typical of canonical secondary structures. This observation showed that this peptide adopted a disordered conformation in this medium.

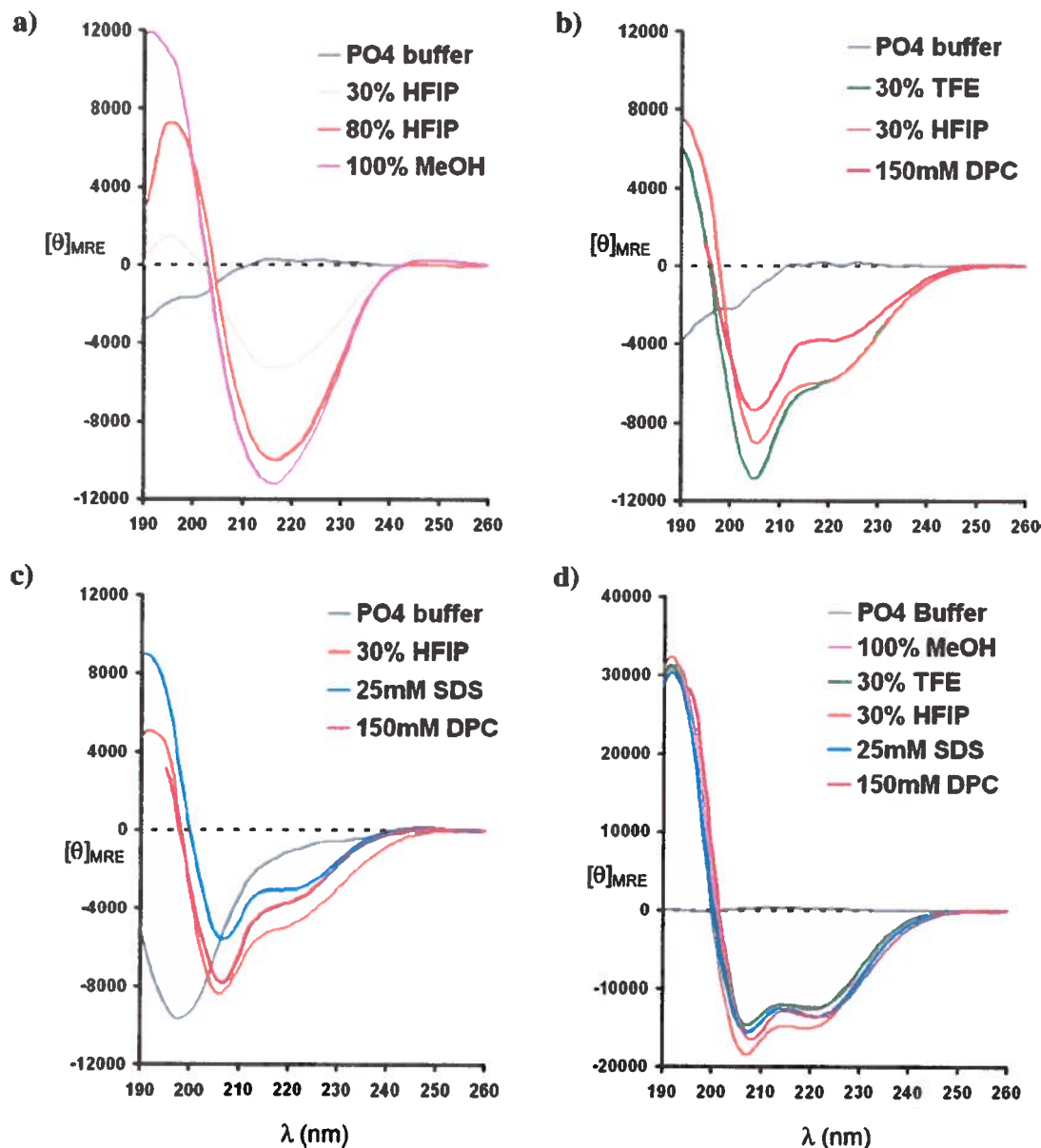


FIGURE 3: Circular dichroism (CD) spectra of (a) EC-I, (b) EC-II, (c) EC-III, and (d) TM-IV in a variety of solvents (or media). Ellipticity is reported as mean residue molar ellipticity ($[\theta]_{\text{MRE}}$) in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$.

However, as shown in Figure 3b, in the presence of organic solvents or DPC micelles, the CD spectra exhibited two minima at 208 and 222 nm, a characteristic that is typically found with the α -helix conformation. In organic solvent/buffer mixtures, all analyzed peptides showed a higher helical content than that in a micellar DPC environment. However, when increasing the concentration of the organic solvent up to 80%, a decrease of the molar ellipticity measured at 222 nm was observed, suggesting a decrease of solubility for the peptide at higher concentrations of TFE or HFIP. Deconvolution of the spectra with DICHROPROT gave, in DPC, a helical content of 18%, corresponding to approximately 6 residues, and a helix content of about 30% in HFIP or TFE, corresponding to approximately 8–10 residues out of 31.

The CD spectrum of EC-III in phosphate buffer was characterized by a strong negative signal at 198 nm, which can be associated with a random-coil arrangement (Figure

3c). A similar spectrum was observed in neat MeOH or in the presence of TFE. However, the addition of HFIP or detergents such as SDS and DPC resulted in marked changes in the CD spectra, consistent with an increase of secondary structure content that can be correlated to an α -helix geometry, as shown by the negative Cotton effects appearing at 208 and 222 nm. Using the DICHROPROT software, the helical content can be estimated at 16% in SDS micelles, at 18% in DPC micelles, and at 22% in the HFIP solution. These percentages would correspond to 3, 4, and 5 residues out of 20, in the respective conditions.

As expected, TM-IV adopts a helical conformation in the various media as indicated by the two strong signals of mean molar ellipticity at 208 and 220 nm. These were observed in neat MeOH, 30% TFE, 30% HFIP, 25 mM SDS, and 150 mM DPC (Figure 3d). The CD spectra of TM-IV in all of these mixtures are almost identical, suggesting that the

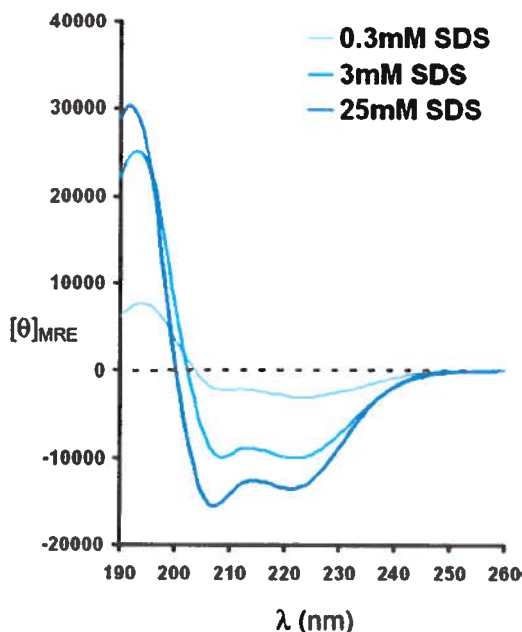


FIGURE 4: CD spectra of TM-IV of the UT receptor in the presence of increasing concentrations of SDS. The critical micellar concentration of SDS is dependent on salt concentration and is around 3.5 mM in a 10 mM phosphate buffer.

secondary structure content of this peptide is not affected by the nature of the solutes composing the medium. Using DICHROPLOT, the α -helical contribution in the overall secondary structure of TM-IV was estimated to be about 50%, which would correspond to 13 residues out of 27. The effect of the SDS concentration on the TM-IV secondary structure was investigated. It can be seen from Figure 4 that in a solution containing only 0.3 mM SDS, a concentration far below the critical micellar concentration, TM-IV is weakly structured. However, around the critical micellar concentration (3 mM) as well as above (25 mM) it, the spectral features typical of the α -helix structure became very apparent. As expected, a similar amount of helical molecular arrangement was observed in 150 mM DPC micelles, a concentration far above the critical micellar concentration (1.5 mM).

DISCUSSION

Upon the binding of a ligand, GPCRs reveal a structural reorganization that leads to receptor activation and the transduction of a signal. This recognition phenomenon involving GPCRs requires the participation of different receptor domains such as the *N*-terminal segment as well as the extracellular loops and/or transmembrane helices. These receptor segments are responsible for the specificity and pharmacological profile. In fact, this was well established with studies of chimeric GPCRs (30). The urotensin-II receptor (UT), formerly known as GPR14, is a G protein-coupled receptor, and therefore, to study the behavior of its specific domains upon the binding of three known ligands (U-II, URP, and urantide), we applied a strategy in which the key receptor segments were individually studied. The UT extracellular loops and transmembrane stretches on which we focused were synthesized using solid-phase peptide synthesis methodology. To achieve the anchoring of the

receptor segments on streptavidin (SA)-coated chips used in surface plasmon resonance technology, we coupled a biotin moiety at the *N*-terminus of each peptide. Also, to prevent potential steric hindrance problems that could occur between streptavidin and the anchored fragments and/or ligands and as an attempt to improve the solubility of the synthetic receptor domains, we introduced a (PEG)₄ spacer. So far, streptavidin was able to recognize the biotinylated compounds, and excellent loads of peptide were attained with extracellular loops I, II, and III. However, even with the tetraPEG spacer-arm, the solubility of transmembrane domains III and IV was too low to permit a convenient load. Nevertheless, as a first step, the affinity properties of the ligands toward the synthetic extracellular loop fragments were measured with surface plasmon resonance technology. SPR data showed that U-II and URP specifically bind to extracellular loop II, suggesting that this extracellular domain is involved in the affinity phenomenon related to these two agonists. Interestingly, Boucard et al. (23) have previously described, using photolabeling techniques, that two methionine residues (184 and 185) of rat UT are chemically modified upon binding and UV illumination of a U-II-derived photoprobe. These two amino acids are also found in human UT, and they are positioned at the boundary of extracellular loop II and transmembrane helix IV. Therefore, our binding data in combination with Boucard's results support the hypothesis that EC-II is a crucial receptor constituent for the binding of UT agonists.

Our study also provided information suggesting that extracellular loop III would be implicated in the U-II recognition process. Again, although measured affinities were in the μ M range, both U-II and URP exhibited specific binding in the presence of the synthetic EC-III fragment. Thus, SPR results, either with EC-II or EC-III, showed in both cases affinities in the μ M range. This observation suggested that the SPR conditions that were used for the analyses probably did not favor an optimized folding of the immobilized receptor fragments, a requirement for a more potent binding. This postulate is supported by the CD data that showed that the helicity in the EC-II and EC-III domains was promoted, especially in membrane-mimicking environments. Hence, it appeared that UT agonists would produce their biological effects following a common binding pattern involving EC-II and EC-III. These results support the theoretical model of Lavecchia et al. (22) who proposed, using a structural homology evaluation of an agonist-hUT complex, a major role for the extracellular domains in the binding of P5U, a super U-II-derived agonist of UT (31). Nevertheless, even though experimental and theoretical data strongly suggest the involvement of EC-II and EC-III in the binding of the U-II and URP agonists, other structural UT elements such as the Asp¹³⁰ residue of TM-III (19, 22) are probably essential for the expression of a potent affinity.

Urantide is a peptidic antagonist of UT that was described in 2003 by Patacchini et al. (32). We used this peptide in the SPR experiments to check its affinity toward the synthetic UT fragments. In contrast to the results obtained with agonists U-II and URP, SPR data showed that urantide bound only to the EC-II domain. This finding suggests that extracellular loop III would be important not only for the recognition process with a ligand but also for triggering the cascade of events leading to cell response. Moreover, it seems

that potent UT antagonists could be designed by developing high affinity ligands specific for EC-II. So far, the nature of the interaction of U-II or URP with the EC-II or EC-III domains as well as that of urantide with EC-II is not yet characterized. Nonetheless, SPR assays of the UT fragments, carried out with other peptides not related to urotensin II (bradykinin, angiotensin II, NPY, and IRL-1620), showed that the binding of the three UT ligands was specific. Furthermore, the binding data cannot be explained only by a physicochemical parameter such as an ionic interaction. As a matter of fact, EC-II is a peptide containing several basic residues, and therefore, it exhibits a large positive charge. Nevertheless, it was observed that among the three ligands that were analyzed, URP, a peptide with a net +1 charge, was the ligand showing the best affinity compared to that of urantide (charge 0) and U-II (charge -1). Also, URP contains only one carboxylate function that is located at the C-terminus, and SAR studies (19) demonstrated that the C-terminal capping of urotensin II, using amidation, had no effects on the affinity or activity. Therefore, residues able to come into close contact, for instance, through hydrophobic interactions, are present in the sequence of the EC-II peptide fragment and in the three UT ligands. Structure-activity relationship analyses (19) reported the importance of the aromatic residues Trp and Tyr located within the cyclic core of the members of the U-II peptide family. Hence, one of these two amino acids, or both, probably interacts with short hydrophobic strands situated in the EC-II and EC-III loops. Besides, this hypothesis is further supported by SAR and conformational data (32), which showed that the inversion of chirality of the Trp residue, in the analogue [Pen⁵, Orn⁸]-hU-II(4-11), produced a potent antagonist (urantide). Thus, the identity of the extracellular loop residues participating in this putative hydrophobic interaction remains to be established, but the second half of EC-II and the first half of EC-III, because of their inherent hydrophobicity, are probably the locations containing the key moieties.

To explore the potential molecular arrangement of UT, we carried out, using circular dichroism spectroscopy, an analysis of the secondary structure adopted by the synthetic receptor fragments in various aqueous and organic media, including cell membrane-mimicking conditions. The use of receptor fragments was considered to be suitable because the propensity of a peptide or a protein to adopt a particular folding is primarily related to the amino acid sequence. Moreover, previous 3D conformational studies of the 7TM domain proteins, bovine rhodopsin (33) and bacteriorhodopsin (34, 35) as well as those of 4TM domain proteins such as myohemerythrin (36) showed that the structural fragments of a receptor frequently adopt a geometry very similar to that found in the native molecule. As a matter of fact, this approach was also used before to study the structural domains of some GPCRs in the absence of X-ray diffraction data (37-41).

With CD analyses, it was observed that TM-IV adopts a stabilized α -helix conformation when dissolved in a medium containing organic solvents or cosolutes able to form micelles. Hence, the stability of this helical structure is rather high and present in a large variety of solvent conditions, including neat MeOH, aqueous fluorinated solvents, and micelle conditions. Using DICHROPROT, an estimate of the helix structure population was made from the CD spectra.

Data suggested a content of 50% helical conformation, and this would correspond to approximately four turns of a helix. These results are supported by AGADIR, an algorithm designed for the prediction of helical structures, which proposed a high helicity for this transmembrane segment. Also, CD spectroscopy showed that EC-I exhibited a partial β -strand/random coil conformation when dissolved in an organic medium. Spectrum analysis using deconvolution suggested that about 10 residues are involved in the β -strand. These results are in agreement with the PHD prediction algorithm, which calculated that EC-I would contain two β -sheet segments corresponding to residues 111-118 and 122-126 of hUT, respectively. Moreover, AGADIR correlated the CD data and the PHD prediction method by establishing that the EC-I domain does not contain any α -helix arrangement.

The second extracellular loop of most GPCRs is usually the largest one and is considered to be highly susceptible to interactions with ligands. For EC-II, the CD results showed a combination of α -helix/random coil conformations, as those observed in solvent conditions including fluorinated alcohols (TFE, HFIP) or dodecylphosphocholine (DPC), a micelle producer. The deconvolution of the EC-II spectra suggested that the peptide molecule contains a α -helix consisting of 6-10 residues. This result is not in agreement with the estimate made with AGADIR, which predicted two α -helix domains located at the N- (UT₁₈₃₋₁₉₃) and C-termini (UT₂₀₅₋₂₁₀) of the fragment. In fact, those segments probably include a few residues of TM-IV and TM-V, which are causing the initiation of helical turns, because the exact N- and C-boundaries of the EC-II loop cannot be established with precision. Hence, it is probable that the helix geometry observed by CD for EC-II comes in part from the secondary structure adopted by both extremities of the receptor fragment. Because of the purported role of EC-II, particularly in the binding process, it is unlikely that this loop does not adopt a highly predominant conformation in the native receptor. Therefore, the absence of a prevalent secondary structure in EC-II suggests that key constraints are missing in the fragment. Extracellular loop II contains a cysteine residue (Cys¹⁹⁹) that is hypothesized to form a disulfide bridge with another cysteine (Cys¹²³) found in the first extracellular loop. This S-S bond was shown to be essential for the binding and activation of many GPCRs, such as the human VIP receptor (42) and the angiotensin II type 2 receptor (43). In the case of the EC-II of UT, we showed that the corresponding fragment is able to specifically recognize two agonists and one peptidic antagonist, thus demonstrating that the disulfide bridge is probably useful but not essential for the expression of the affinity. Nevertheless, the presence of such a covalent bond between EC-I and EC-II, which brings down EC-II closer to the cell membrane surface (22), is most likely a factor contributing to the stabilization of the folding of this receptor component. Furthermore, the neighboring of both loop boundaries, as produced in the native receptor by the anchoring of the EC-II extremities to transmembrane domains IV and V, respectively, could also be a critical driving force in inducing a stable molecular structure in EC-II. Nonetheless, although in its actual form only two to three turns of a helix are suggested for EC-II by the CD data, it is postulated that the helical structure is a requirement for ligand binding.

The CD spectrum of EC-III showed a pattern similar to that of EC-II. In an aqueous buffer, this peptide showed no specific structure. However, upon the addition of HFIP or micelle makers such as SDS or DPC, EC-III also exhibited some propensity to adopt a helical structure. This CD result is in agreement with the AGADIR algorithm, which proposes a helix folding involving about 4–9 residues, into segment UT (290–298), and corresponding to one to two turns. These would be approximately located in the second portion of the peptide sequence and would correspond to segment 290–298 of UT, where a purported site accessible for a hydrophobic interaction with the indole moiety of the Trp residue located in the cyclic core of U-II is found.

CONCLUSIONS

In line with previous studies carried out with known GPCRs that showed that the membrane domains of a receptor adopt frequently a geometry very similar to that found in the native molecule, we analyzed a number of structural characteristics and affinity properties of some urotensin-II receptor (UT) segments. Thus, using synthetic UT fragments related to the structural domains, we showed that EC loop II was able to recognize the ligands U-II, URP, and urantide, whereas EC loop III bound only to U-II and URP. These two fragments exhibited some helicity, which could be correlated to the affinity. Indeed, these binding properties were not shared with EC-I, a peptide in which a β -strand arrangement prevailed. Furthermore, the absence of binding of urantide, a peptide antagonist, strongly suggested that loop III would be involved in the signal transduction process. The specificity measured during the affinity assessment and the particular folding observed with the three extracellular loops showed that the strategy yielded data highlighting two key structural domains, EC-II and EC-III. Moreover, the results indicate that potent UT antagonists could be designed by producing high affinity ligands targeting extracellular loop II.

REFERENCES

- Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, H., Barkley, M., Nishioka, R. S., and Bern, H. A. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 5021–5024.
- Bern, H. A., and Lederis, K. (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts, *J. Endocrinol.* **45**, Suppl. 11–12.
- Conlon, J. M., Yano, K., Waugh, D., and Hazon, N. (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates, *J. Exp. Zool.* **275**, 226–238.
- Conlon, J. M., O'Harte, F., Smith, D. D., Tonon, M. C., and Vaudry, H. (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 578–583.
- Coulouarn, Y., Jegou, S., Tostivint, H., Vaudry, H., and Lihmann, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors, *FEBS Lett.* **457**, 28–32.
- Conlon, J. M., Tostivint, H., and Vaudry, H. (1997) Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives, *Regul. Pept.* **69**, 95–103.
- Douglas, S. A., and Ohlstein, E. H. (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease, *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 229–237.
- Camarda, V., Rizzi, A., Calo, G., Gendron, G., Perron, S. I., Kostenis, E., Zamboni, P., Mascoli, F., and Regoli, D. (2002) Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **365**, 141–149.
- Douglas, S. A., Sulpizio, A. C., Piercy, V., Sarau, H. M., Ames, R. S., Aiyar, N. V., Ohlstein, E. H., and Willette, R. N. (2000) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey, *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1262–1274.
- Behm, D. J., Harrison, S. M., Ao, Z., Maniscalco, K., Pickering, S. J., Grau, E. V., Woods, T. N., Coatney, R. W., Doe, C. P., Willette, R. N., Johns, D. G., and Douglas, S. A. (2003) Deletion of the UT receptor gene results in the selective loss of urotensin-II contractile activity in aortae isolated from UT receptor knockout mice, *Br. J. Pharmacol.* **139**, 464–472.
- Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M., Loudon, C. S., Foley, J. J., Sauermeier, C. F., Coatney, R. W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S. D., Stadel, J. M., Martin, J. D., Liu, W. S., Glover, G. I., Wilson, S., McNulty, D. E., Ellis, C. E., Elshourbagy, N. A., Shabon, U., Trill, J. J., Hay, D. W., Ohlstein, E. H., Bergsma, D. J., and Douglas, S. A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14, *Nature* **401**, 282–286.
- Liu, Q., Pong, S. S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A. D., Williams, D. L., Jr., Davidoff, M., Wang, R., Austin, C. P., McDonald, T. P., Bai, C., George, S. R., Evans, J. F., and Caskey, C. T. (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 174–178.
- Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H. H., Saldivia, V. R., Cheng, R., Murphy, P. M., Tsui, L. C., Shi, X., Gregor, P., and et al. (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors, *Genomics* **29**, 335–344.
- Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1, *Br. J. Pharmacol.* **131**, 441–446.
- Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S., and Fournier, A. (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 1200–1209.
- Flohr, S., Kurz, M., Kostenis, E., Brkovich, A., Fournier, A., and Klabunde, T. (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure–activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II, *J. Med. Chem.* **45**, 1799–1805.
- Grieco, P., Rovero, P., and Novellino, E. (2004) Recent structure–activity studies of the peptide hormone urotensin-II, a potent vasoconstrictor, *Curr. Med. Chem.* **11**, 969–979.
- Labarrere, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M. C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2003) Structure–activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **18**, 77–88.
- Kinney, W. A., Almond Jr, H. R., Qi, J., Smith, C. E., Santulli, R. J., de Garavilla, L., Andrade-Gordon, P., Cho, D. S., Everson, A. M., Feinstein, M. A., Leung, P. A., and Maryanoff, B. E. (2002) Structure–function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand–receptor working model, *Angew. Chem., Int. Ed.* **41**, 2940–2944.
- Bhaskaran, R., Arunkumar, A. I., and Yu, C. (1994) NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II, *Biochim. Biophys. Acta* **1199**, 115–122.
- Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boularan, C., Carlier, L., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M. C., Lihmann, I., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2004) Structure–activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide, *Peptides* **25**, 1819–1830.
- Lavecchia, A., Cosconati, S., and Novellino, E. (2005) Architecture of the human urotensin II receptor: comparison of the binding domains of peptide and non-peptide urotensin II agonists, *J. Med. Chem.* **48**, 2480–2492.
- Boucard, A. A., Sauve, S. S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003) Photolabeling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain, *Biochem. J.* **370**, 829–838.

24. Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein., *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132.
25. Tusnady, G. E., and Simon, I. (2001) The IIMMTOPT transmembrane topology prediction server, *Bioinformatics* **17**, 849–850.
26. Munoz, V., and Serrano, L. (1997) Development of the multiple sequence approximation within the AGADIR model of alpha-helix formation: comparison with Zimm-Bragg and Lifson-Roig formalisms, *Biopolymers* **41**, 495–509.
27. Rost, B., and Sander, C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure, *Proteins* **19**, 55–72.
28. Cserzo, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., and Simon, I. (2002) On filtering false positive transmembrane protein predictions, *Protein Eng.* **15**, 745–752.
29. Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6th**, 175–182.
30. Yin, D., Gavi, S., Wang, H. Y., and Malbon, C. C. (2004) Probing receptor structure/function with chimeric G-protein-coupled receptors, *Mol. Pharmacol.* **65**, 1323–1332.
31. Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Zampelli, E., Patacchini, R., Maggi, C. A., Novellino, E., and Rovero, P. (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge, *J. Med. Chem.* **45**, 4391–4394.
32. Patacchini, R., Santicoli, P., Giuliani, S., Grieco, P., Novellino, E., Rovero, P., and Maggi, C. A. (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta, *Br. J. Pharmacol.* **140**, 1155–1158.
33. Yeagle, P. L., Danis, C., Choi, G., Alderfer, J. L., and Albert, A. D. (2000) Three-dimensional structure of the seventh transmembrane helical domain of the G-protein receptor, rhodopsin, *Mol. Vis.* **6**, 125–131.
34. Kutragadda, M., Alderfer, J. L., and Yeagle, P. L. (2000) Solution structure of the loops of bacteriorhodopsin closely resembles the crystal structure, *Biochim. Biophys. Acta* **1466**, 1–6.
35. Nikiforovich, G. V., Galaktionov, S., Balodis, J., and Marshall, G. R. (2001) Novel approach to computer modeling of seven-helical transmembrane proteins: current progress in the test case of bacteriorhodopsin, *Acta Biochim. Pol.* **48**, 53–64.
36. Dyson, H. J., Merutka, G., Waltho, J. P., Lerner, R. A., and Wright, P. E. (1992) Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I. Myohemerythrin, *J. Mol. Biol.* **226**, 795–817.
37. Ruan, K. H., So, S. P., Wu, J., Li, D., Huang, A., and Kung, J. (2001) Solution structure of the second extracellular loop of human thromboxane A2 receptor, *Biochemistry* **40**, 275–280.
38. Ulfers, A. L., Piserchio, A., and Mierke, D. F. (2002) Extracellular domains of the neurokinin-1 receptor: structural characterization and interactions with substance P, *Biopolymers* **66**, 339–349.
39. Demene, H., Granier, S., Muller, D., Guillon, G., Dufour, M. N., Delsuc, M. A., Hibert, M., Pascal, R., and Mendre, C. (2003) Active peptidic mimics of the second intracellular loop of the V(1A) vasopressin receptor are structurally related to the second intracellular rhodopsin loop: a combined 1H NMR and biochemical study, *Biochemistry* **42**, 8204–8213.
40. Giragossian, C., and Mierke, D. F. (2001) Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin A receptor, *Biochemistry* **40**, 3804–3809.
41. Zhang, L., DeHaven, R. N., and Goodman, M. (2002) NMR and modeling studies of a synthetic extracellular loop II of the kappa opioid receptor in a DPC micelle, *Biochemistry* **41**, 61–68.
42. Knudsen, S. M., Tams, J. W., Wulff, B. S., and Fahrenkrug, J. (1997) A disulfide bond between conserved cysteines in the extracellular loops of the human VIP receptor is required for binding and activation, *FEBS Lett.* **412**, 141–143.
43. Heerding, J. N., Hines, J., Fluharty, S. J., and Yee, D. K. (2001) Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin II type 2 receptor, *Biochemistry* **40**, 8369–8377.

BI060190B

2.2 Article 2

2.2.1 Mise en contexte de l'article 2

Le premier article démontre que les boucles extracellulaires II et III participent à la liaison de différents ligands sélectifs à UT. Ces résultats suggèrent que ces deux domaines adoptent une conformation précise qui oriente et positionne correctement des éléments chimiques et structuraux essentiels pour la liaison de ligands. Ces résultats semblent indiquer également que ces domaines pourraient adopter une géométrie spatiale qui pourrait se rapprocher de celle observée dans la structure native de UT. Cette hypothèse est soutenue par les résultats de dichroïsme circulaire qui démontrent la propension de ces domaines à adopter une conformation organisée, stable et partiellement hélicoïdale en solution. Ainsi, basée sur les résultats de RPS et de dichroïsme circulaire, nous avons choisi de poursuivre l'étude structurale par RMN de EC-II et EC-III.

Lorsque nous avons amorcé notre étude par RMN, la structure fine de la rhodopsine venait depuis peu d'être caractérisée par cristallographie à haute résolution. Ainsi, notre étude s'inscrivait dans un besoin de caractériser la structure des RCPGs et de percer les mécanismes impliqués dans la reconnaissance de leurs ligands. Ainsi, notre étude avait pour but de 1) caractériser la structure moléculaire précise de ces deux domaines en utilisant la RMN et la modélisation moléculaire, et 2) identifier si possible les résidus impliqués directement ou indirectement dans l'interaction avec U-II à l'aide du titrage par RMN. Puisque le domaine EC-I n'avait pas démontré d'interaction avec U-II, URP et l'urantide lors de l'étude par RPS, celui-ci ne présentait pas un intérêt urgent pour l'étude par RMN. De plus, malgré le fait que le domaine EC-I avait montré pouvoir adopter une conformation partielle en feuillet- β dans des milieux tels que l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et le méthanol (MeOH), celui-ci manifestait des problèmes de solubilité aux concentrations nécessaires pour son analyse par RMN.

Nous avons choisi d'utiliser un environnement micellaire pour réaliser l'étude structurale de EC-II et EC-III car ce milieu offre des conditions quasi-idéales pour étudier une protéine membranaire. Sous ces conditions, l'analyse par RMN a permis de mettre en évidence des segments hélicoïdaux bien structurés dans EC-II et EC-III, confirmant ainsi, dans un premier temps, les résultats obtenus préalablement par CD. Dans un second temps, les analyses RMN ont précisé la nature et la position des domaines structurés. Ainsi, nous avons pu démontrer que EC-II comporte deux segments en hélice- α entre les résidus P183-R192 et P205-R209 réunis par un segment de conformation aléatoire. Ces deux domaines hélicoïdaux semblent correspondre à la fin du domaine transmembranaire IV et au début du domaine transmembranaire V. L'analyse par RMN de EC-III a permis de caractériser un coude- β de type III pour le segment Q285-L288 suivi d'une hélice- α (A289-L299) qui correspond au début du segment transmembranaire VII. Les données retrouvées dans cet article représentent les premières données structurales expérimentales sur certaines régions de UT reconnues pour interagir avec U-II. Nos données contribuent, entre autres, à préciser la limite des domaines transmembranaires IV, V, VI et VII du côté extracellulaire.

Nous présentons également dans cet article les résultats du titrage par RMN de EC-III en présence de U-II. Plusieurs résidus de EC-III ont montré être perturbés par l'addition de U-II. Ces perturbations surviennent d'une manière concentration dépendante, ce qui suggère que ces résidus interagissent directement avec le ligand ou se retrouvent dans l'environnement immédiat du site de liaison. La présence de faibles NOEs intermoléculaires entre EC-III et U-II suggère aussi l'existence d'interactions et des points de contact entre les deux entités.

Le titrage de EC-II en présence de U-II a permis également d'observer une perturbation de quelques signaux. Cependant, contrairement aux analyses avec EC-III et U-II, la complexité des spectres de titrage EC-II/U-II n'a pas permis d'identifier des NOEs intermoléculaires sans ambiguïtés. De plus, le nombre important de résidus composant EC-II, ainsi que la présence de quelques formes minoritaires ont rendu l'interprétation des données incertaines. Étant donné que le titrage de EC-II/U-II n'a pas été concluant, nous avons choisi de ne pas inclure ces données dans le second article, et

du fait, par souci de cohérence, de retirer les données de la structure de EC-II afin de se concentrer sur EC-III. Ainsi, nous présentons dans cet article la structure de EC-III en relation avec l'étude d'interactions avec U-II. Cette étude contribue à une meilleure connaissance du mécanisme de liaison, mais également à l'approfondissement de notre compréhension de la structure du récepteur UT en apportant des données expérimentales sur la conformation de ces domaines extracellulaires.

2.2.2 Contribution de l'étudiant à l'article 2

Un stage préalablement réalisé en 2002 à l'Université de Rouen, sous la direction de Dr Davoust, avait permis ma familiarisation avec les différentes techniques d'acquisition, d'analyse et d'attribution par RMN pour les peptides, un apprentissage nécessaire à la réalisation de cette étude. J'ai également eu la chance durant ce stage d'être co-auteur d'un article portant sur l'étude structurale du 26RFa, un neuropeptide récemment identifié par l'équipe du Dr Hubert Vaudry (121). Puisqu'une étroite collaboration s'était établie entre nos deux laboratoires, j'ai choisi de réaliser ma thèse en cotutelle avec le Pr Davoust et de réaliser l'étude structurale des domaines de UT par RMN à l'Université de Rouen.

Tous les travaux d'acquisition RMN ont été pilotés et largement effectués par moi-même sous la supervision des Drs Guilhaudis et Oulyadi. Par la suite, j'ai utilisé ces données pour construire un ensemble de contraintes et générer par modélisation moléculaire des modèles structuraux pour EC-III, sous la supervision des Drs Ségalas-Milazzo et Guilhaudis. Lors de mes travaux, un nouveau membre, Dr Coadou, s'est joint à l'équipe de biologie structurale de l'IRCOF. Celui-ci a contribué à mon projet en développant, entre autres, des outils informatiques qui ont facilité et accéléré le processus d'analyse des structures de EC-III. Parallèlement à l'analyse structurale de EC-III, j'ai également réalisé le titrage par RMN du complexe EC-III/U-II afin d'identifier les résidus impliqués dans l'interaction entre les deux molécules. De par leur nature, les

analyses ont mené à des discussions de groupes impliquant tous les auteurs de cet article afin d'arriver à une interprétation adéquate et de s'assurer de l'exactitude des résultats. L'ensemble des travaux et des résultats fait l'objet du deuxième article qui a été écrit par moi dans un premier temps, revu par les Drs Guilhaudis et Ségalas-Milazzo, et révisé par mes directeurs les Drs Davoust et Fournier.

2.2.3 Résumé et copie de l'article 2

SOLUTION STRUCTURE OF UROTENSIN-II RECEPTOR EXTRACELLULAR LOOP III & CHARACTERIZATION OF ITS INTERACTION WITH UROTENSIN-II

*Stéphane Boivin, Isabelle Ségalas-Milazzo, Laure Guilhaudis, Hassan Oulyadi, Alain
Fournier and Daniel Davoust*

L'urotensine-II est un peptide vasoactif qui exerce son activité biologique via un récepteur appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G, nommé UT. Récemment, nous avons démontré, en utilisant la résonance plasmonique de surface, que U-II peut interagir avec les domaines structuraux hUT(182-212) et hUT(281-300) [Boivin, S., et al. (2006) *Biochemistry* 45, 5993-6002]. Afin de poursuivre la caractérisation du complexe UT/U-II, nous avons caractérisé la structure en solution du domaine hUT(281-300) ou EC-III par RMN à haute résolution et utilisé la modélisation moléculaire. Nous avons également par RMN examiné à l'échelle moléculaire la liaison de hU-II. Nous avons déterminé dans un environnement micellaire constitué de DPC, que hUT(281-300) est formé d'un coude- β de type III (Q285-L288) suivi par une hélice- α (A289-L299) qui correspond au début du segment transmembranaire VII. De plus, suite à l'addition de U-II, les signaux de certains résidus de EC-III sont perturbés. Ces signaux sont situés principalement dans la région C-terminale du segment EC-III et sont localisés du même côté de l'hélice transmembranaire-VII. Ces données sont en accord avec des NOEs intermoléculaires qui suggèrent que le TM-VII est impliqué dans la liaison et permettent de proposer des points d'interaction entre le ligand et son récepteur.

Article publié dans: Peptides. 2008; vol. 29 (5), p:700-710

Article 2

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Peptides. 2008 May;29(5):700-10.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.02.024>

Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II.

Boivin S, Ségalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Fournier A, Davoust D.

Table S1. Proton chemical shifts of hUT(281-300) in 150 mM DPC at 600 MHz and 313 K.

Residue	Shift of proton resonance (ppm) ^a				
	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	Others
A281	-	4.07	1.44		
Q282	8.56	4.33	1.94 / 1.89	2.24	H ^δ 7.43 / 6.80
Y283	8.28	4.52	2.92		H ^δ 7.05; H ^ε 6.76
H284	8.34	4.58	3.20 / 3.07		NH ^δ 7.21; H ^ε 8.55
Q285	8.31	4.22	2.04 / 1.94	2.31	H ^δ 7.50 / 6.79
A286	8.29	4.56	1.37		
P287		4.44	2.26 / 1.88	2.00	H ^δ 3.77 / 3.62
L288	8.17	4.33	1.62 / 1.52	1.67	H ^δ 0.87
A289	8.50	4.55	1.44		
P290		4.36	2.36 / 1.96	2.10 / 2.03	H ^δ 3.80 / 3.71
R291	8.65	4.13	1.94 / 1.86	1.81 / 1.67	H ^δ 3.19; H ^ε 7.55
T292	7.83	3.91	4.23	1.22	
A293	8.08	4.03	1.43		
R294	7.88	4.11	1.93	1.77 / 1.66	H ^δ 3.23; H ^ε 7.47
I295	7.71	3.88	2.03	1.74 / 0.95	H ^δ 0.87
V296	7.97	3.62	2.11	1.01 / 0.93	
N297	8.13	4.48	2.76		H ^δ 7.44 / 6.79
Y298	7.69	4.39	3.15		H ^δ 7.11; H ^ε 6.78
L299	7.57	4.27	1.83 / 1.72	1.97	H ^δ 0.92
T300	7.35	4.29	4.29	1.18	

^aRelative to DSS

-Not available

Table S2. Proton chemical shifts of hU-II in 150 mM DPC at 600 MHz and 313 K.

Residue	Shift of proton resonance (ppm) ^a				
	H ^N	H ^α	H ^β	H ^γ	Others
E1	-	4.04	2.07 / 2.01	2.35 / 2.30	
T2	-	-	4.12	1.25	
P3		4.43	2.25 / 1.89	1.97	H ^δ 3.80 / 3.70
D4	8.37	4.56	2.61		
C5	7.89	4.97	2.95 / 2.90		
F6	8.70	4.50	3.09 / 2.98		H ^{δ/ε/ζ} 7.15
W7	8.53	4.37	3.49 / 3.11		H ^{δ1} 7.23; H ^{ε1} 10.64; H ^{ε3} 7.48; H ^{η2} 7.13; H ^{ε2} 7.50; H ^{ε3} 7.05
K8	7.08	3.93	1.59	0.67 / 0.57	H ^δ 1.34 / 1.29; H ^ε 2.71
Y9	8.13	4.56	3.20 / 2.92		H ^δ 7.11; H ^ε 6.77
C10	8.09	4.98	3.05 / 2.91		
V11	7.86	4.00	2.13	0.91	

^aRelative to DSS

-Not available

Table S3. Description of hydrogen bonds for residues Q285-T300			
Donor Residue (HN)	Acceptor Residue (O)	% of presence	Distance range (Å)
L288	Q285	83%	(1.72—3.05)
A289	Q285	92%	(1.60—3.10)
A289	A286	78%	(2.14—3.17)
R291	L288	95%	(1.83—3.03)
T292	L288	97%	(1.63—3.17)
T292	A289	57%	(2.07—3.11)
A293	A289	100%	(1.63—3.13)
R294	P290	92%	(1.72—3.11)
R294	R291	67%	(2.17—3.20)
I295	R291	79%	(1.72—3.18)
I295	T292	87%	(1.90—3.18)
V296	T292	100%	(1.68—3.04)
N297	A293	100%	(1.58—3.07)
Y298	R294	98%	(1.66—3.06)
Y298	I295	76%	(2.00—3.19)
L299	I295	89%	(1.71—3.17)
L299	V296	98%	(1.88—3.11)
T300	V296	86%	(1.68—3.13)

Table S4. Mean ϕ/ψ values		
Residue	Angle	Average (°)
A281	PSI	-173 +/- 57
Q282	PHI	-106 +/- 58
	PSI	163 +/- 90
Y283	PHI	-93 +/- 82
	PSI	175 +/- 77
H284	PHI	-126 +/- 63
	PSI	-135 +/- 75
Q285	PHI	-93 +/- 29
	PSI	-49 +/- 18
A286	PHI	-45 +/- 12
	PSI	-50 +/- 8
P287	PHI	-66 +/- 10
	PSI	-33 +/- 7
L288	PHI	-70 +/- 7
	PSI	-38 +/- 10
A289	PHI	-52 +/- 8
	PSI	-50 +/- 5
P290	PHI	-56 +/- 3
	PSI	-40 +/- 7
R291	PHI	-64 +/- 7
	PSI	-50 +/- 6
T292	PHI	-65 +/- 10
	PSI	-44 +/- 9
A293	PHI	-61 +/- 8
	PSI	-38 +/- 12
R294	PHI	-62 +/- 9
	PSI	-42 +/- 10
I295	PHI	-65 +/- 8
	PSI	-47 +/- 7
V296	PHI	-61 +/- 6
	PSI	-51 +/- 8
N297	PHI	-66 +/- 7
	PSI	-29 +/- 15
Y298	PHI	-81 +/- 14
	PSI	-21 +/- 11
L299	PHI	-86 +/- 12
	PSI	-35 +/- 13
T300	PHI	-131 +/- 80

Figure S1

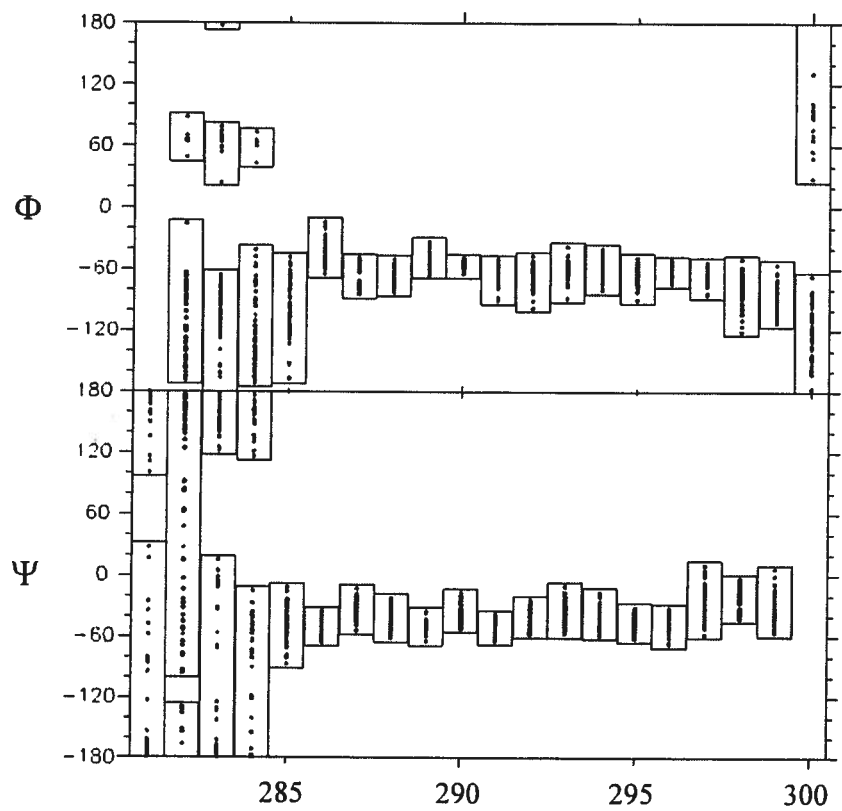


Figure S2

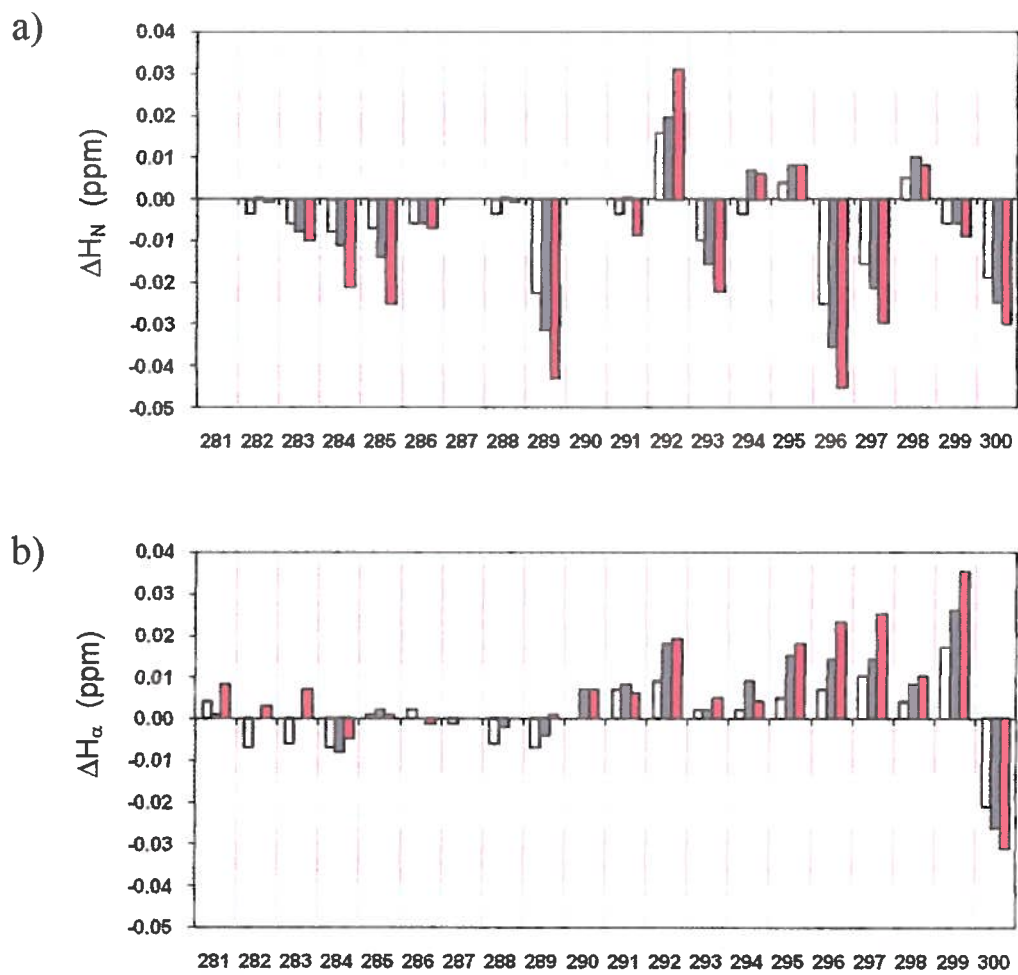
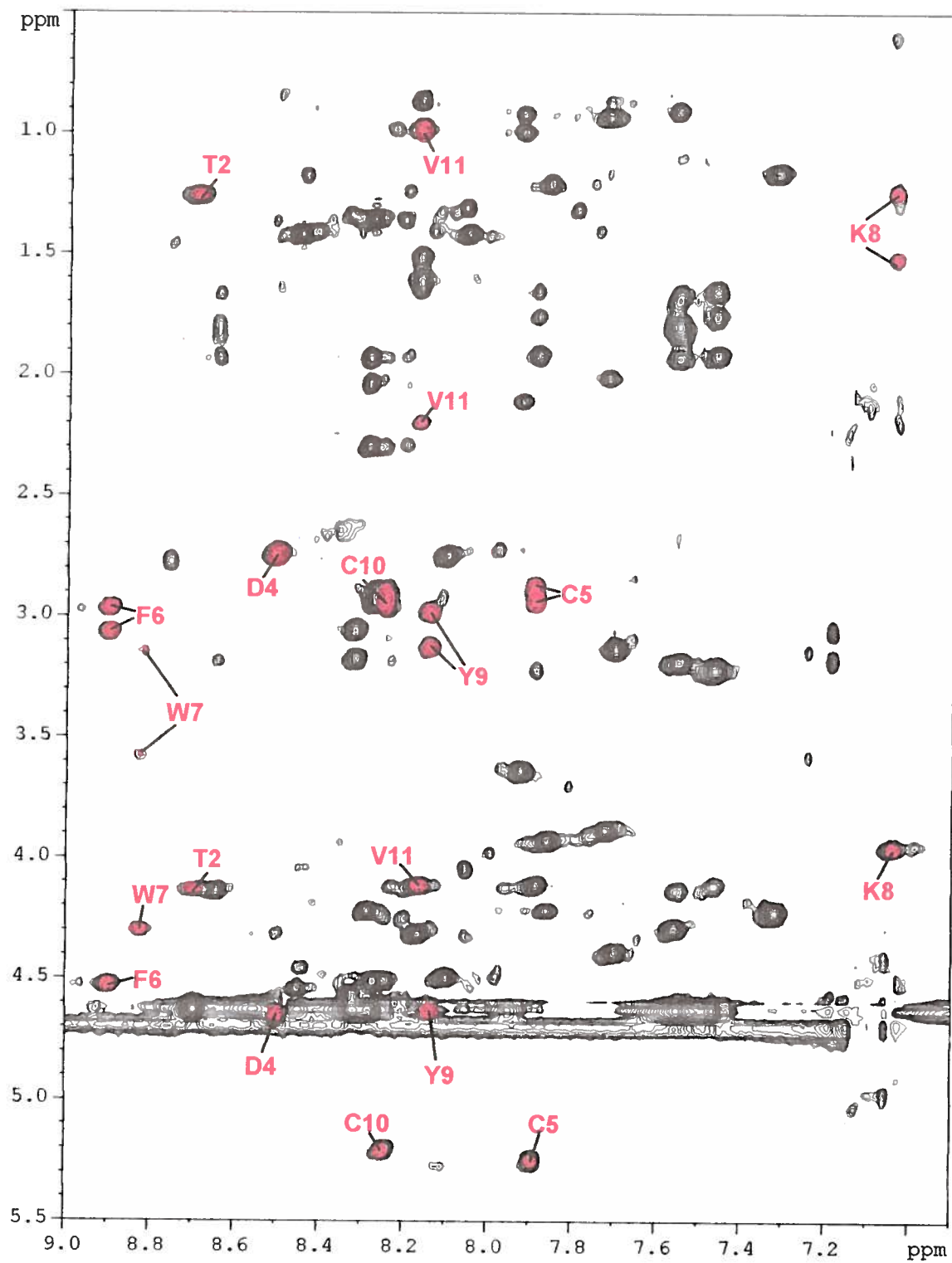


Figure S3



Chapitre 3: Discussion & conclusion

La présence dominante de l'urotensine-II ainsi que de son récepteur dans le système cardiovasculaire fait en sorte qu'un déséquilibre neurohormonal et/ou une activité déficiente du récepteur peuvent contribuer au développement de certaines pathologies. Actuellement, le système urotensinergique est étudié dans le cadre de certaines pathologies dont l'asthme (65), les accidents cardiovasculaires (122), l'hypertension (123, 124), l'infarctus du myocarde (125) et l'insuffisance cardiaque (64) et rénale (126). Donc, la démonstration de la participation de l'U-II dans diverses pathologies est un objectif majeur et seule la découverte d'autres outils pharmacologiques tels que des agonistes et des antagonistes du récepteur UT facilitera la compréhension du rôle de U-II et de son récepteur dans l'organisme et comme agent étiologique de maladies. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques nécessite une meilleure connaissance du système urotensinergique et tout particulièrement d'une bonne compréhension de l'interaction entre l'U-II et son récepteur. Dans cet ordre d'idée, nous avons entrepris d'étudier le mécanisme de liaison entre l'U-II et son récepteur. Pour ce faire, nous avons divisé cette étude en deux volets, soit 1) l'identification des domaines de liaisons de l'UT, et 2) la caractérisation de la structure de ces domaines et de la nature des interactions par RMN.

3.1 Première partie: Identification des domaines de liaison

3.1.1. Choix des domaines structuraux

En conformité avec notre stratégie, nous avons tout d'abord ciblé des domaines structuraux de UT reconnus ou suspectés d'interagir avec U-II. Dans un premier temps, nous nous sommes basés sur les données retrouvées dans la littérature afin de guider notre choix dans la sélection de domaines structuraux précis. Les boucles extracellulaires par leur forte taille et leur présence du côté extracellulaire sont susceptibles de jouer un rôle de premier plan en interagissant avec les ligands de nature peptidique. Cette idée a été confirmée à plusieurs reprises pour d'autres RCPGs. En effet, une série d'études utilisant des moyens originaux comme les récepteurs tronqués, les récepteurs chimères et les récepteurs mutés ont permis d'identifier les boucles extracellulaires comme éléments clefs à la liaison des ligands (127-130). De plus, il a été démontré que certaines boucles extracellulaires peuvent, entre autres, moduler la sélectivité pour différents ligands. Ceci a été démontré pour les récepteurs de l'endothéline (131, 132) et des opioïdes (128). Ainsi les trois boucles extracellulaires de UT sont d'un intérêt certain pour étudier le complexe U-II/UT. Nous nous sommes également intéressés aux domaines transmembranaires III et IV puisque des données dans la littérature suggèrent leur implication dans la liaison de U-II. En effet, une interaction électrostatique est souvent observée entre les ligands et un résidu Asp conservé chez les RCPGs et présent dans le TM-III (118, 119). Ce résidu est présent chez hUT (Asp130) et a servi de base pour élaborer par homologie des modèles du complexe U-II/UT (101, 120). Ces modèles renforcent l'hypothèse d'une interaction entre Asp130 de UT et un résidu chargé tel que Lys8 de U-II. Pour le TM-IV, il a été démontré par photomarquage qu'un analogue photosensible de hU-II peut lier deux résidus méthionine (Met185 et Met188) présents dans le TM-IV de rUT (89). Chez l'isoforme humaine de UT, un seul résidu méthionine est conservé. Cependant, ce résidu pourrait interagir avec U-II et c'est pourquoi nous avons opté d'inclure ce domaine dans le cadre de notre étude. Ainsi, nous avons choisi de

synthétiser les trois boucles extracellulaires (EC-I, EC-II, et EC-III), ainsi que le TM-III et le TM-IV.

3.1.2 Prédiction de la topologie de UT

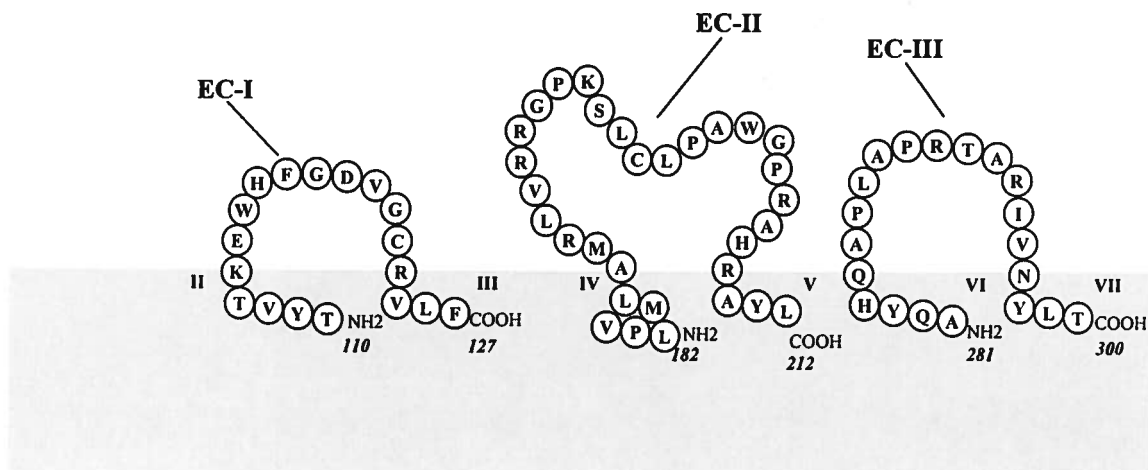
Différents programmes ont été utilisés pour déterminer la position des domaines transmembranaires de UT et leur topologie à partir de la séquence connue du récepteur. Tous sont accessibles *via* ExPASy (<http://ca.expasy.org/>); HMMTOP (133, 134); SOSUI (135); TMHMM (136) et TopPred (137). Ces logiciels utilisent des critères distincts basés sur la nature des résidus, la probabilité de retrouver certains types de résidus dans un domaine transmembranaire, et l'accessibilité au solvant. Ils constituent un moyen rapide et efficace, sans avoir la prétention d'être parfaitement juste, d'estimer la position de domaines transmembranaires et par conséquent des boucles cellulaires. Afin d'augmenter notre degré de confiance dans les prédictions, les séquences alignées dont les prédictions différaient dans la position des domaines transmembranaires ont été comparées (chaque séquence par chaque programme). Les différences se situent principalement aux extrémités des structures des TM-II, TM-V et TM-VI. Néanmoins, les résultats ont pu être conciliés en un seul modèle et ainsi déterminer la position des sept domaines transmembranaires, des trois boucles intra et extracellulaires, ainsi que des régions N- et C-terminales (Figure 12).

3.1.3 Synthèse des domaines structuraux

Nous avons accordé une grande importance à la dimension et à la séquence des segments peptidiques devant mimer les domaines structuraux sélectionnés (EC-I, EC-II, EC-III, TM-III et TM-IV). Il a été démontré que le choix du peptide (15-18 a.a.) peut favoriser un coude dans une boucle alors que la synthèse d'un plus long peptide comprenant des résidus appartenant aux TMs adjacents facilite la stabilisation du domaine en «hélice-coude-hélice» (37). Cependant, l'introduction de résidus appartenant aux TMs peut induire un problème de solubilité du peptide. Pour ces raisons, nous avons

choisi de synthétiser, en conformité avec la topologie prédite du récepteur UT, trois peptides composés des séquences entières des trois boucles extracellulaires additionnés de part et d'autre de quelques résidus (≈ 4 résidus / 1 tour d'hélice) correspondant aux domaines transmembranaires respectifs. Le but de ces constructions est de favoriser la stabilisation de la structure des boucles en ayant ainsi des sites d'ancrage dans un milieu micellaire sans compromettre dramatiquement la solubilité générale des domaines. Ainsi, les séquences des domaines structuraux extracellulaires tiennent compte de la dimension théorique de ceux-ci, auxquelles nous avons ajouté en moyenne 8 résidus correspondants à 1 tour d'hélice à chaque extrémité. (Figure 15). À l'opposé, nous avons choisi de synthétiser les segments transmembranaires III et IV en entier avec l'ajout d'un court segment (6-8 résidus) appartenant à la boucle extracellulaire adjacente; cette démarche voulait faciliter la solubilité en milieu aqueux en ajoutant ainsi la présence de résidus chargés (Figure 15).

a)



b)

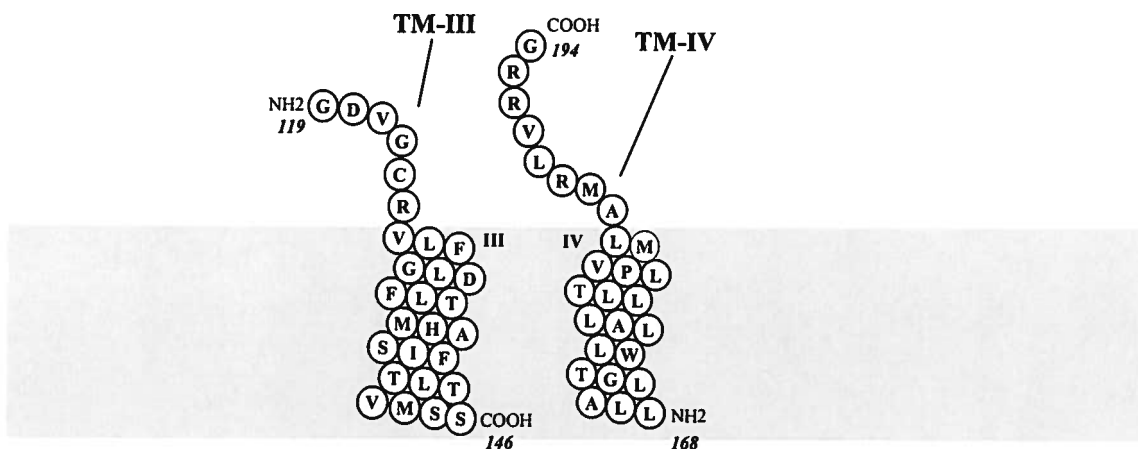


Figure 15. Représentation des domaines structuraux de UT synthétiques.

Dans le cadre du projet de doctorat, cinq peptides ont été synthétisés en phase solide à l'aide de la chimie Fmoc correspondant aux domaines structuraux de UT soit EC-I, EC-II, EC-III, TM-III et TM-IV.

Après avoir précisé les séquences des peptides ou domaines structuraux, la synthèse de ceux-ci s'est avérée la première manipulation en laboratoire. Ainsi, cinq peptides composés de 18 à 31 résidus ont été synthétisés dans le but de mimer les trois boucles extracellulaires et deux domaines transmembranaires d'UT (Tableau 3). Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de synthèse peptidique sur phase solide. La synthèse des boucles extracellulaires a été effectuée sans difficulté majeure à l'aide d'un protocole de chimie Fmoc. La synthèse des TMs, avec la même chimie, s'est avérée plus difficile et a nécessité la reprise de plusieurs couplages. L'hydrophobicité de ces domaines a probablement limité l'accès des réactifs et des solvants ce qui a diminué les rendements de couplage. Afin de favoriser la solubilité de ces domaines et minimiser la formation d'agrégats durant les étapes de la synthèse, du DMSO a été ajouté lors de la réaction de couplage. En effet, le DMSO est un solvant reconnu pour ses qualités désagrégantes et pour favoriser la solubilisation des peptides hydrophobes. L'élongation de la chaîne peptidique s'est effectuée sans problème sous ces conditions. Ainsi, le DMSO semblerait avoir provoqué un changement majeur dans l'organisation structurale des segments TM-III et TM-IV. Or, l'inconvénient associé à l'utilisation du DMSO dans la solution de couplage est le risque de provoquer des réactions secondaires d'oxydation au niveau des résidus méthionines. Afin de s'assurer de l'homogénéité et de la nature exacte des domaines structuraux, les peptides ont été séquencés et analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. L'absence de réactions secondaires dominantes a pu ainsi être ainsi être vérifiée puisque les peptides synthétisés avaient tous la masse attendue. Par la suite, les peptides ont été purifiés par CLHP préparative en phase inverse (colonne C₁₈ ou C₄) jusqu'à l'obtention d'une pureté égale ou supérieure à 95% telle qu'évaluée par CLHP analytique. Il est à noter que le domaine transmembranaire III n'a pu être purifié. En effet, ce peptide très hydrophobe ne pouvait être solubilisé que dans des solvants organiques tels que le DMSO ou l'acétonitrile (ACN). Ce phénomène peut être expliqué par la nature des résidus qui compose ce peptide. Contrairement au TM-IV qui possède une charge totale de +3, le TM-III affiche une charge nette nulle. Dans ces conditions, il est clair que ce peptide ne peut être utilisé dans le cadre d'une étude d'interactions par RPS qui s'effectue en milieu aqueux. Nous avons dû exclure le TM-III de notre étude compte tenu de sa faible solubilité intrinsèque.

Tableau 3. Description des fragments synthétiques de UT.

Segment	Séquence	Nb. résidus	Localisation
	[NH ₂ → COOH]		
(110-127)UT	TYVTKEWHFGDVGCRVLF	18	EC-I
(182-212)UT	LPVMLAMRLVRRGPKSLCLPAWGPRAHAYL	31	EC-II
(281-300)UT	AQYHQAPLAPRTARIVNYLT	20	EC-III
(119-146)UT	GDVGCRVLFGLDFLTMHASIFTLTVMSS	28	TM-III
(168-194)UT	LLALGTWLLALLLTLPVMLAMRLVRRG	27	TM-IV

3.1.4 Analyse des interactions par RPS

La technologie BIAcore correspond à des biocapteurs qui utilisent un phénomène optique, la résonance plasmonique de surface (RPS), pour détecter en temps réel l'association et la dissociation entre des molécules. Le ligand est immobilisé de manière covalente ou non à un biocapteur. L'analyte est injecté par la suite en flux continu. Les variations de masse à la surface du biocapteur, ou puce, sur lequel un des deux interactants est immobilisé, sont perçues par l'appareil au moyen de la résonance plasmonique de surface. Les variations du signal RPS (exprimées en unités de résonance), sont tracées en fonction du temps. Les courbes d'interaction qui en résultent sont appelées «sensogrammes». Leur analyse mathématique permet une caractérisation quantitative précise des interactions moléculaires : paramètres cinétiques et thermodynamiques, stœchiométrie, etc. Cette technique a l'avantage d'être très sensible ce qui permet même de mesurer de faibles interactions entre deux molécules. Nous avons donc utilisé cette technologie de choix pour évaluer et mesurer l'affinité de trois ligands sélectifs de UT, dont deux agonistes (U-II, URP) et un antagoniste (urantide), pour nos domaines structuraux de UT.

Dans un premier temps, nous avons choisi de fixer les domaines UT individuellement à la puce, et par la suite de faire circuler à la surface les différents

analytes (U-II, URP et urantide). Plusieurs stratégies d'immobilisation sont disponibles pour fixer les domaines UT à la puce. Cependant, puisque nos domaines comportent tous des résidus hydrophobes appartenant aux TMs, l'utilisation de micelles semblait le moyen le plus naturel. Ainsi, nous avons solubilisé les domaines dans un détergent appelé le palmitoyl-oléyl-phosphatidylcholine (POPC) qui est un des constituants les plus abondants des membranes plasmiques animales (138). Cette méthode offre l'opportunité d'étudier les domaines structuraux dans un environnement qui mime la surface biologique (139). Par la suite, nous avons immobilisé les domaines de UT intégrés dans les vésicules de POPC sur une puce L1 (Biacore); cette dernière est recouverte de longues chaînes alkylées. Ainsi, lorsqu'injectés sur la surface, les liposomes sont retenus par des interactions de nature hydrophobe. Dans le cas des domaines structuraux, les micelles ont été retenus efficacement par les chaînes alkylées de la puce (Figure 16). Cependant, lors des tests de liaison avec U-II, URP et Urantide, aucun de ces ligands n'a été capable d'interagir avec les domaines UT immobilisés dans les micelles. Deux hypothèses étaient possibles. La première est que U-II, URP et Urantide ne possèdent pas d'affinité pour les différents domaines d'UT. La seconde est que les domaines d'UT ne sont pas ou peu intégrés aux micelles et du coup, les ligands circulent au-dessus d'une surface dépourvue de domaines. Puisque nous ne disposons pas d'outils moléculaires afin de confirmer l'intégration des domaines UT dans les micelles comme des anticorps dirigés contre les domaines d'UT, nous étions dans l'impossibilité de trancher entre les deux hypothèses sans ambiguïté. Puisqu'il y avait d'autres moyens de fixer les domaines UT à la puce, nous avons décidé d'opter pour une méthode différente nous permettant de confirmer l'immobilisation des domaines à la surface du biocapteur.

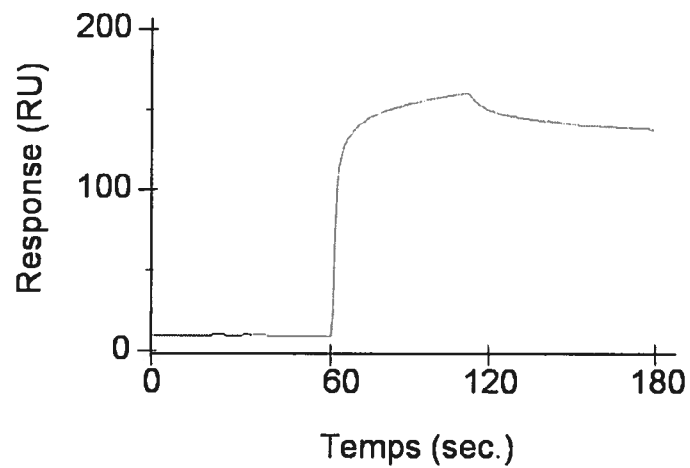


Figure 16. Immobilisation en RPS de micelles/EC-II sur une surface hydrophobe.

Après avoir équilibré le milieu pendant 60 secondes, nous avons injecté une solution eau/POPC contenant le domaine EC-II de UT. Nous avons alloué 60 secondes pour la période d'association et de dissociation. Nous pouvons constater l'interaction des micelles POPC avec la matrice hydrophobe.

La solution de rechange que nous avons retenue a été d'exploiter la forte affinité entre la streptavidine et la biotine dans le but de fixer les domaines UT sur la puce (Article 1). Nous avons tout d'abord attaché par synthèse chimique, en position N-terminale de tous les domaines, un espaceur hydrophile (Figure 17) couplé à une molécule de biotine. L'ajout de l'espaceur de type polyéthylène glycol servait à prévenir l'encombrement stérique que pourrait induire la proximité de la biotine au segment peptidique, tout en contribuant à augmenter la solubilité des domaines structuraux. Ainsi, après la synthèse et la purification des domaines chimiquement modifiés, nous avons injecté sur la surface d'une puce recouverte de streptavidine, les domaines UT soit (bt-peg)EC-I, (bt-peg)EC-II et (bt-peg)EC-III, puis évalué par RPS leur capacité à interagir avec U-II, URP et urantide. Les segments TM-III et TM-IV se sont montrés insolubles en milieu aqueux et par conséquent, ils n'ont pu être immobilisés. Cependant, pour les autres domaines, ceux-ci ont été fixés efficacement à la puce de façon quasi-irréversible considérant que la constante de dissociation biotine-streptavidine est de l'ordre du femtomole.

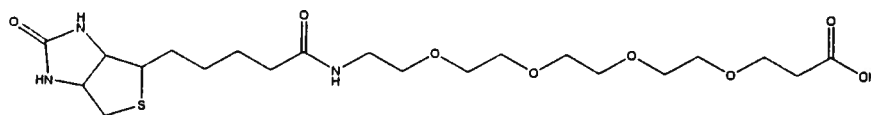


Figure 17. Structure de l'acide «dPEG₄TM-biotine» qui a été ajouté à l'extrémité N-terminale des domaines UT pour les analyses par RPS.

Comme démontré dans le premier article, les résultats de RPS montrent que EC-II interagit de façon concentration-dépendante avec les trois ligands U-II, URP et urantide. EC-III reconnaît les agonistes U-II et URP, alors qu'aucun de ces ligands n'est retenu par EC-I (Figure 18). De plus, les domaines structuraux n'ont pas été en mesure d'interagir avec des peptides contrôles (bradykinine, angiotensine-II), ce qui démontre la sélectivité des ces domaines pour les ligands de UT. Ces résultats suggèrent un rôle pour EC-II et EC-III dans la reconnaissance des ligands agonistes de UT, et pour EC-II dans la reconnaissance des ligands antagonistes. L'ensemble des résultats suggère que l'U-II et l'URP lient le récepteur UT suivant un mécanisme moléculaire commun, mais pas l'urantide. De plus, l'absence de liaison de l'urantide, un peptide antagoniste, à la boucle

EC-III, suggère fortement que cette boucle extracellulaire est impliquée dans le processus de signalisation intracellulaire. Ces résultats suggèrent que de puissants antagonistes de UT pourraient être développés en produisant des ligands de haute affinité ciblant la boucle EC-II. De plus, puisque l'urantide est un antagoniste compétitif, il peut être proposé que U-II et urantide possèdent au moins un site de liaison commun soit EC-II. Nos résultats concordent avec d'autres observations faites entre autres pour le récepteur GnRH, pour lequel certains résidus présents dans la boucle extracellulaire-II peuvent moduler la liaison agoniste -vs- antagoniste (140).

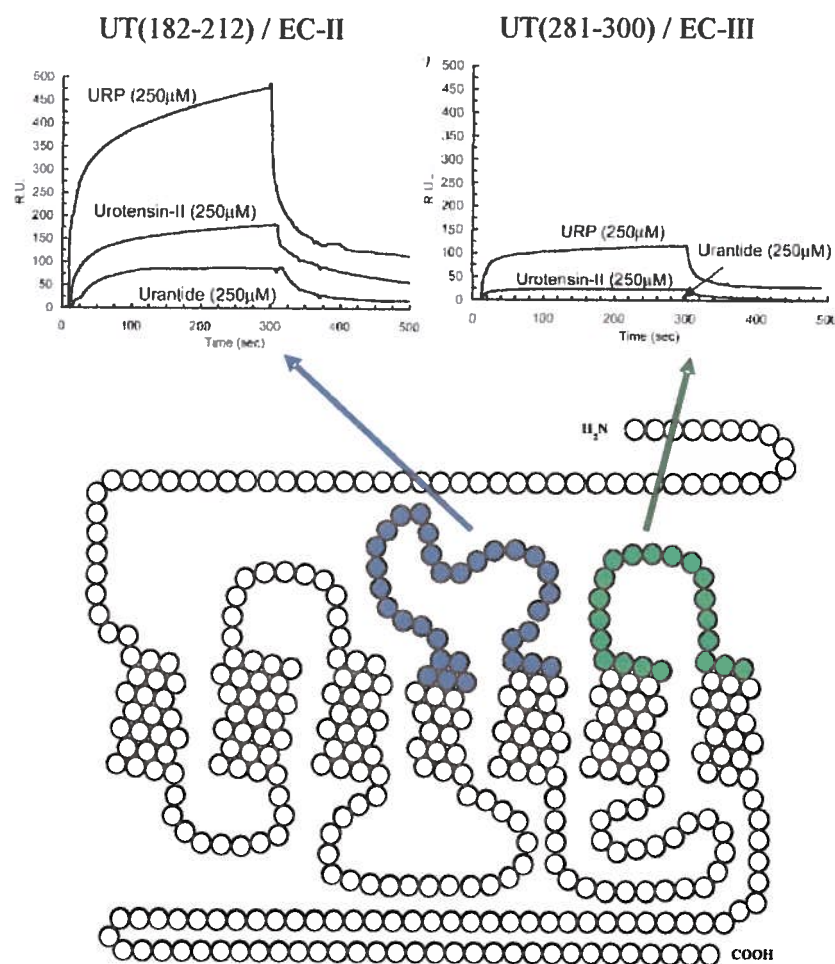


Figure 18. Résumé des résultats des tests de liaison par RPS de EC-II et EC-III.

L'affinité des peptides correspondant aux domaines structuraux EC-I, EC-II et EC-III pour les ligands U-II, URP et Urantide a été évaluée par RPS. Seuls les domaines structuraux EC-II et EC-III représentés en bleu et vert respectivement ont démontré pouvoir lier des ligands sélectif à UT. Le segment peptidique correspondant à EC-I n'ayant pas démontré d'affinité n'est pas représenté.

Il est à propos de noter que le domaine EC-II se trouve, dans le modèle de la rhodopsine, fortement replié au point de recouvrir la presque totalité de la pochette de liaison (Figure 19). Cet arrangement structural expose EC-II à de nombreux contacts avec la portion extracellulaire du récepteur, et dans le cas de la rhodopsine avec le rétinol lui-même (141). Cet arrangement suggère que EC-II se retrouve au cœur du récepteur et pourrait entrer en contact avec U-II et URP ce qui faciliterait la transition du récepteur vers l'état actif (142-146), ou en présence d'uranide, prévenir son activation. La boucle extracellulaire-II a également été montrée comme importante pour la formation d'autres complexes ligand/RCPG. C'est d'ailleurs le cas du récepteur adrénergique (147), du récepteur du thromboxane A2 (130), du récepteur des neurokinines (143, 148), du récepteur opioïde kappa (128) et de plusieurs autres (145, 146, 149, 150). La boucle extracellulaire-III se retrouve à proximité de la boucle extracellulaire-II dans le modèle de la rhodopsine. Ainsi, cette structure semble indiquer que EC-II et EC-III feraient partie du site de liaison de UT. Or, plusieurs articles décrivent un rôle pour la boucle extracellulaire-III dans le mécanisme de liaison de différents RCPGs (45, 118, 151) ce qui confirme le rôle de premier plan joué par les domaines extracellulaires dans la liaison. Cependant, le fait que EC-I ne soit pas reconnu par les différents ligands suggère a priori que ce domaine ne serait pas directement impliqué dans l'interaction avec ceux-ci. Cependant, il faut interpréter avec prudence ce résultat. Certaines hypothèses peuvent être formulées. Par exemple, il est possible qu'une mauvaise conformation du domaine EC-I empêche l'orientation de certaines chaînes latérales de résidus cruciaux pour le processus de reconnaissance. Ceci pourrait provenir du fait que certains résidus voisins importants pour la conformation de EC-I soient manquants ce qui aurait pour effet de déstabiliser la structure générale du complexe. Il est également possible que le milieu choisi n'ait pas permis de stabiliser la structure secondaire du peptide correspondant à cette boucle. Ainsi, le fait que EC-I n'ait pas reconnu les ligands de UT ne permet pas de conclure avec certitude que ce domaine ne participe pas à la reconnaissance du ligand, d'autant plus que d'autres études présentent la boucle extracellulaire-I comme un des éléments impliqués directement dans le processus de liaison (129, 152, 153).

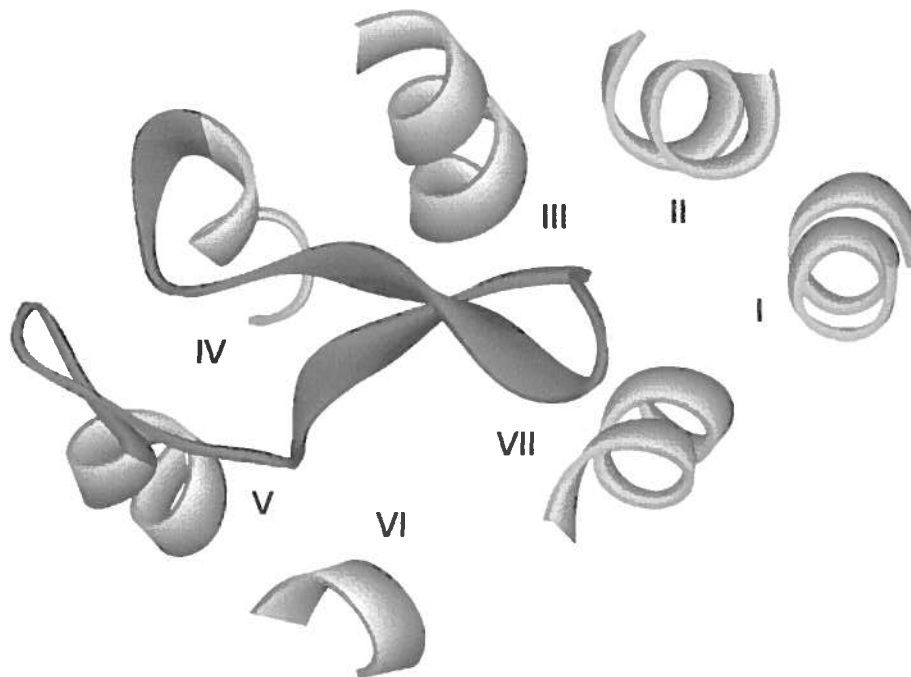


Figure 19. Représentation de la seconde boucle extracellulaire de la rhodopsine bovine reliant les TM-IV et -V.

L'élucidation de la structure de la rhodopsine bovine par cristallographie (1F88.pdb) à permis de mettre en évidence que la boucle extracellulaire 2 se trouve fortement repliée au point de recouvrir la presque totalité de la pochette de liaison.

L'affinité observée entre les ligands et les domaines de UT ($K_d \approx 10^{-6}M$) est faible comparativement à l'affinité de U-II pour le récepteur dans sa forme native ($K_d = 10^{-9}M$). Certains facteurs peuvent expliquer les faibles affinités observées comme l'absence de contraintes structurales telles que le pont disulfure entre les structures EC-I et EC-II. Malgré qu'il n'y ait pas de données expérimentales sur l'importance de ce pont disulfure, celui-ci s'est avéré essentiel au maintien de l'affinité et de l'activation du récepteur VIP (154). Comme ce pont disulfure serait aussi présent dans le récepteur UT (155), il est possible que sa présence modifierait la conformation de EC-II et ainsi exposerait davantage certains résidus impliqués dans la liaison de U-II. Le fait que EC-II et EC-III ne présentent qu'une portion de l'affinité usuelle de UT pour U-II suggère que d'autres éléments structuraux ou chimiques sont nécessaires pour assurer une forte affinité. En ce sens, il est probable que la présence simultanée des trois boucles extracellulaires puisse contribuer à une haute affinité ligand/récepteur. L'immobilisation d'un seul peptide composé de EC-I, EC-II et EC-III pontés entre eux, sur une même surface de biocapteur, pourrait contribuer à augmenter l'affinité observée avec les ligands de UT. Quelques publications supportent cette hypothèse. Par exemple, une équipe a reconstruit la surface intégrale cytoplasmique de la rhodopsine bovine à l'aide de peptides reliés les uns aux autres afin de mimer la surface cytoplasmique de la protéine (156). Ils ont démontré que ce modèle mimait la conformation active de la protéine en étant capable de stimuler la protéine-G. À la lumière de ces résultats, il serait intéressant de réunir les boucles extracellulaires et de réévaluer par RPS l'affinité des ligands afin de vérifier si la présence des trois boucles contribue à retrouver une haute affinité.

L'utilisation de la RPS pour l'étude de fragments de RCPGs est en soi originale puisque cette technique est principalement employée pour l'étude de plus grosses molécules telles que des protéines: antigène-anticorps, enzyme-cofacteur, protéine-protéine, protéine-ADN, etc. Notre étude constitue, vraisemblablement la première étude utilisant la RPS comme outil pour identifier et caractériser l'interaction entre des fragments d'un RCPG et différents ligands peptidiques. Il est pertinent de souligner que nos travaux ont été suivis par la première étude utilisant la RPS pour évaluer la liaison d'un ligand peptidique, la neurotensine, à un récepteur entier de type RCPG (157).

3.2 Deuxième partie: Étude structurale

3.2.1 Analyse par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est un outil de choix pour obtenir de l'information sur la nature de la structure secondaire de protéines et de peptides. La technique repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée. En fait, l'absorption d'une lumière polarisée circulairement vers la droite ou vers la gauche s'effectue différemment selon la structure secondaire en présence. Ainsi, l'absorption préférentielle d'une de ces deux lumières polarisées résultera en une déviation de la résultante que nous appelons dichroïsme circulaire. Les résultats, sous forme de spectres, sont caractéristiques pour les structures secondaires principales retrouvées soit l'hélice, le feuillet et le coude β . Nous avons utilisé cette technique pour évaluer la structure secondaire dominante des domaines synthétiques de UT. L'analyse par CD se veut, entre autres, une étape préliminaire avant de poursuivre l'analyse conformationnelle des domaines UT par résonance magnétique nucléaire. En fait, le CD permet d'explorer la solubilité et la conformation de peptides dans différents milieux afin de déterminer les meilleures conditions d'analyse. Le CD est donc utilisé pour déterminer la structure de protéines et de peptides, et en particulier, il a déjà permis d'étudier avec succès la structure secondaire de domaines structuraux de récepteur (42-44, 118, 158, 159). Ainsi, nous avons évalué les structures secondaires globales des domaines synthétiques de UT, c'est-à-dire les trois boucles extracellulaires ainsi que le TM-IV, dans trois milieux aqueux contenant un alcool (30-80% TFE, 30-80% HFIP, 100% MeOH) et deux milieux micellaires (25mM SDS, 150mM DPC). Nous avons retenu le HFIP et le TFE (160) car ceux-ci sont reconnus pour stabiliser la conformation des peptides en solution. De plus, nous avons utilisé le SDS (161) et le DPC, deux détergents, qui ont la propriété de former des micelles en milieu aqueux afin d'obtenir un environnement hydrophobe qui mime la membrane cellulaire.

Les spectres de dichroïsme circulaire sont décrits en détails dans l'article 1. De façon générale, l'analyse par CD des domaines UT confirme la propension des fragments peptidiques de UT à adopter une conformation stable et organisée en solution. Le domaine EC-I est composé en partie d'un feuillet- β , tandis que les autres domaines adoptent une conformation partiellement composée d'hélices (Figure 20). Le fait que EC-I adopte une conformation partielle en feuillet- β en présence d'un co-solvant tel le TFE ou le MeOH est plutôt étonnant. Les structures en feuillet- β impliquent généralement des interactions de longue distance pour être stabilisées contrairement aux hélices- α dont l'organisation repose essentiellement sur des interactions à courte distance. Ce résultat est d'autant plus surprenant que EC-I ne possède que 18 résidus ce qui réduit les probabilités d'observer ce type d'interaction entre des résidus éloignés. Évidemment, la présence d'un feuillet- β peut expliquer la faible solubilité de ce domaine. En effet, les peptides qui adoptent ce genre de structure sont reconnus pour présenter des difficultés au niveau de leur solubilisation. Les structures en feuillet- β observées dans des peptides sont stabilisées par de nombreuses interactions hydrophobes au niveau des chaînes latérales situées de part et d'autre de la molécule qui peuvent être à l'origine de la formation d'agrégats. Ceci suggère que les conditions d'analyse utilisées pour la RPS n'ont pas stabilisé adéquatement la structure de EC-I, ce qui peut avoir empêché ou réduit la liaison avec l'urotensine-II et les autres ligands. Pour EC-II et EC-III, les spectres de CD suggèrent un caractère hélicoïdal. Ceci est en accord avec la prédiction de la présence de courts segments appartenant aux domaines transmembranaires IV, V, VI et VII (Figure 20). Les structures hélicoïdales sont tout particulièrement bien stabilisées en présence d'un environnement hydrophobe. De plus, sous la concentration micellaire critique (CMC) du SDS, les structures hélicoïdales sont désordonnées ce qui confirme que l'environnement micellaire est favorable à la stabilisation de EC-II et EC-III.

Ces résultats sont les premières données structurales expérimentales qui ont été publiées sur la structure du récepteur UT. Ces résultats soutiennent les résultats obtenus par RPS et l'hypothèse que le domaine EC-II possède des déterminants structuraux nécessaires à la liaison de U-II, URP et de l'urantide, alors que le domaine EC-III affiche plutôt des pharmacophores pour la liaison de U-II et de URP. De plus, le fait que ces

domaines UT adoptent une géométrie spatiale ordonnée et que certains interagissent sélectivement avec U-II, URP et/ou urantide, permet de générer l'hypothèse que les domaines synthétiques de UT conservent, lorsqu'étudiés en solution individuellement, des éléments structuraux et des déterminants de la sélectivité de la protéine native.

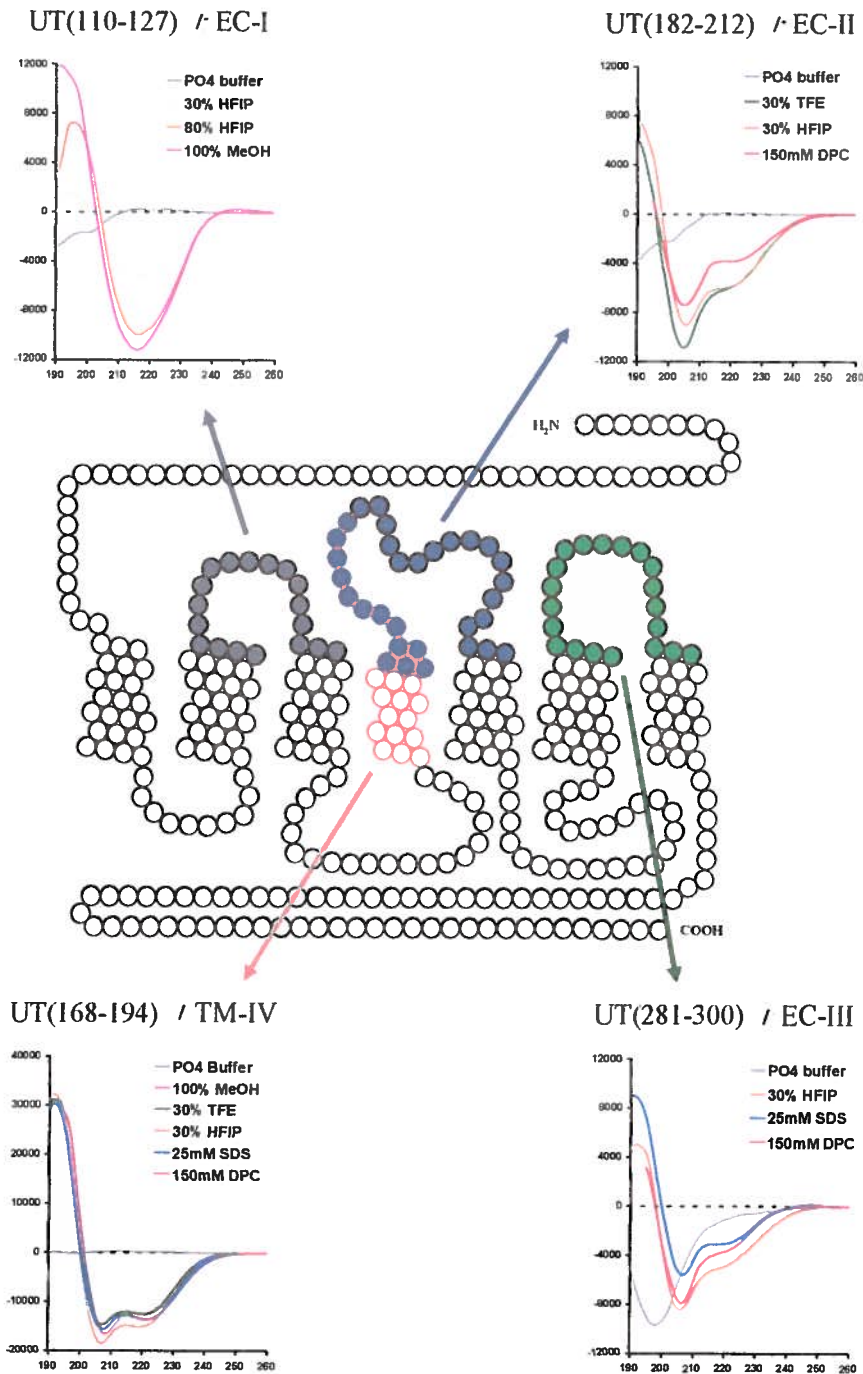


Figure 20. Résumé des résultats de l'analyse des domaines de UT par CD.

Les cinq domaines structuraux synthétiques de UT ont été étudiés par CD dans divers milieux (MeOH, HFIP/H₂O, TFE/H₂O, SDS/H₂O, DPC/H₂O). Les spectres obtenus montrent que ces peptides adoptent en solution une structure en hélice- α et/ou feuillet- β . Ces résultats confirment la propension des fragments peptidiques de UT à adopter une conformation moléculaire organisée en solution.

3.2.2 Analyses par RMN

Le nombre de protéines cristallisées ne cesse d'augmenter (162). Toutes ces informations sur les séquences et les structures de protéines sont cruciales pour l'élucidation des mécanismes moléculaires. Connaître la structure des différents ligands et de leur récepteur cible est devenu un enjeu majeur dans la compréhension générale du mécanisme d'activation des RCPGs et, entre autres, pour le développement d'outils pharmacologiques tels des antagonistes. Malheureusement, dans le cas des RCPGs, une seule structure cristallographique est résolue, celle de la rhodopsine bovine (26). Elle constitue en soi la seule et unique référence pour tous les RCPGs (29) sans avoir de certitude que ce modèle est valide pour l'ensemble des RCPGs (163).

La cristallographie des rayons X est une méthode puissante pour l'étude de la structure des protéines tout comme la RMN. L'avantage de la RMN est de pouvoir étudier la structure et les interactions moléculaires en solution (i.e. dans un environnement proche de l'état physiologique). Comme mentionné dans l'introduction, une nouvelle méthode utilisant la RMN est maintenant appliquée pour étudier la structure de RCPGs en évaluant celle-ci par domaines structuraux (voir section 1.1.6).

Les domaines structuraux (EC-II et EC-III) synthétiques, décrits dans notre premier article, ont montré une liaison sélective envers U-II et d'autres ligands de cette même famille suggérant la présence des déterminants structuraux nécessaires à la liaison. Par conséquent, ils doivent adopter une conformation structurale qui est proche de celle observée dans UT sous sa forme native. Ainsi, l'analyse structurale de ces deux domaines synthétiques représente un intérêt certain pour caractériser une partie de la structure tridimensionnelle de UT et de certains de ces déterminants impliqués dans le site de liaison. Cependant, malgré le fait que le domaine EC-I n'ait pas été en mesure de lier les ligands de UT, ce domaine tout comme le TM-IV, a été capable d'adopter une conformation organisée et stable en solution telle qu'évaluée par CD. Ainsi, la caractérisation structurale de EC-I et du TM-IV constitue également un intérêt pour une meilleure compréhension de la conformation générale de la structure de UT. Pour toutes

ces raisons, nous avons donc utilisé la RMN et la modélisation moléculaire pour caractériser les propriétés structurales des quatre domaines structuraux de UT soit EC-I, EC-II, EC-III et TM-IV.

Plusieurs domaines structuraux de la rhodopsine ont été caractérisés avec succès dans le DMSO- d_6 (37, 38). Ce milieu contribue, entre autres, à la solubilité des domaines transmembranaires ce qui réduit la formation d'agrégats et permet de réaliser des acquisitions sur de longues périodes de temps. Puisque les domaines synthétiques de UT comportent la présence de résidus hydrophobes (les extrémités de EC-I, EC-II et EC-III et le segment complet transmembranaire TM-IV), nous avons choisi d'utiliser ce milieu pour réaliser une première analyse structurale de EC-I, EC-III et TM-IV à l'aide de la RMN du proton. L'analyse par RMN a constitué un défi pour l'analyse du TM-IV. Le fait d'avoir plusieurs copies d'un même résidu complique l'identification et l'attribution des différents systèmes. Le TM-IV possède 27 résidus dont 11 leucines, 3 alanines et 3 arginines. L'analyse fine des spectres a cependant permis d'identifier et de discriminer tous les systèmes de spin à l'exception des leucines du TM-IV. En effet, 11 systèmes de spin étaient attendus, mais seuls trois systèmes ont été identifiés ce qui suggère que plusieurs signaux de leucine sont en fait superposés. Cette hypothèse est soutenue par le fait que plusieurs NOEs séquentiels (corrélations $H\alpha_{(i)}/HN_{(i,i+1)}$) sont absents du spectre. Afin de favoriser l'étalement des signaux NH, nous avons réalisé des acquisitions à plusieurs températures se situant entre 295K et 320K. Malheureusement, cette variation de température a provoqué dans l'ensemble les mêmes déplacements chimiques pour tous les systèmes de spin. Le fait que plusieurs leucines soient voisines (LLALGTWLLALLLTLPVMLAMRLVRRG), ces résidus se retrouvent dans le même environnement, et du coup, doivent probablement subir les mêmes perturbations. Étant dans l'impossibilité d'identifier sans ambiguïté les leucines du TM-IV, il a été impossible de construire un jeu de contraintes structurales à partir de nos données. Cependant, pour les domaines EC-I et EC-III, les acquisitions réalisées dans le DMSO- d_6 ont permis d'obtenir un bon rapport signal/bruit ce qui a contribué à l'attribution de tous les systèmes de spin, et ce, quasi sans ambiguïté. Cependant, l'analyse préliminaire des spectres NOESY n'a montré de façon générale que peu ou pas de NOEs pour l'ensemble

des domaines structuraux dans le DMSO. Malgré le fait que ce milieu ait auparavant démontré des propriétés de stabilisation de la formation d'hélices pour d'autres peptides, l'utilisation du DMSO- d_6 comme milieu d'analyse pour nos domaines s'est avérée inadéquate. De plus, le CD n'a pu être utilisé pour déterminer la structure secondaire des domaines dans ce milieu puisque le DMSO exhibe une forte absorbance à l'intérieur de la fourchette de longueurs d'onde utilisées pour les spectres de peptides. Par ailleurs, puisque les spectres obtenus à l'aide du dichroïsme circulaire avaient montré la présence d'un feuillet- β pour EC-I et d'hélices pour les domaines EC-II et EC-III dans différents milieux, nous avons choisi de procéder à l'analyse de ces domaines extracellulaires dans un autre milieu que le DMSO.

Tout d'abord, nous avons repris l'analyse de EC-I par RMN dans le méthanol (CH_3 -OD) puisque ce domaine avait montré en CD qu'il pouvait adopter dans ce milieu une conformation partielle en feuillet- β (CH_3OH). EC-I a été dissous à une concentration de 1mM et analysé par RMN. Les analyses préliminaires n'ont pas permis d'obtenir un bon signal. La faible intensité des signaux suggère que ce peptide n'est pas très soluble à cette concentration dans ce milieu, même si aucun précipité n'a été détecté. Ainsi, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la présence de NOEs $d_{\alpha,N}$ forts (2.2Å) et $d_{N,N}$ faibles (4.3 Å) caractéristiques du feuillet- β . Cependant, il est reconnu que ce type de structure reposant sur des interactions entre résidus éloignés est difficile à stabiliser dans des petits peptides (164, 165). Compte tenu des résultats obtenus et des problèmes de solubilité associés à EC-I à des concentrations nécessaires pour l'analyse par RMN, nous avons choisi d'abandonner à cette étape l'étude structurale de ce peptide.

Nous avons poursuivi les analyses de EC-II et de EC-III dans le dodécylphosphocholine- d_{38} (DPC- d_{38}) dans lequel les analyses par CD avaient identifié une tendance à adopter une conformation hélicoïdale. De plus, l'utilisation du DPC pour étudier la structure des boucles extracellulaires nous a semblé judicieuse puisque ces domaines contiennent à chaque extrémité un court segment correspondant aux passages transmembranaires. Le DPC peut faciliter la conformation hélice-coude-hélice attendue

en favorisant l'ancrage de ces courts domaines transmembranaires à la micelle (43). Ainsi, EC-II et EC-III ont pu être étudiés par RMN dans le DPC-d₃₈.

RMN et modélisation moléculaire de EC-III

Le domaine EC-III s'est montré être très soluble dans le mélange avec le DPC et stable pendant plusieurs semaines ce qui a permis de réaliser l'ensemble des acquisitions par RMN. Les analyses des différents spectres ont permis d'identifier plusieurs NOEs caractéristiques d'hélices. Ainsi, nous avons été en mesure de construire un jeu de contraintes et élaborer ensuite par modélisation moléculaire plusieurs structures à l'aide de CNX (voir section Matériels et Méthodes du second article). Après quelques étapes de raffinement, l'analyse des structures finales a permis de mettre en évidence un coude- β de type-III pour le segment Q285-L288 suivi d'une hélice- α pour le segment A289-L299. Cette hélice semble correspondre au début du segment transmembranaire-VII. La description complète des analyses et des résultats est détaillée dans l'article 2. Les résultats décrivent, entre autres, des structures mieux définies comparativement à celles établies dans le cadre du premier article. En fait, nos données RMN montrent que le domaine transmembranaire VII pourrait être assez long en incorporant des résidus appartenant à la troisième boucle extracellulaire. Des divergences entre les données théoriques et les données expérimentales ont aussi été observées lors d'études structurales pour d'autres RCPGs (46, 149, 166). À l'opposé, l'analyse structurale de EC-III n'a pas permis de mettre en évidence la présence du court segment du TM-VI au niveau de l'extrémité N-terminale puisque ce fragment est demeuré désordonné malgré la présence de micelles. Ceci est peut-être causé par l'absence de résidus adjacents qui seraient essentiels pour stabiliser la conformation. Il est possible que l'addition de quelques résidus permettrait d'initier et de stabiliser la structure hélicoïdale du TM-VI et ainsi permettre de déterminer la limite entre la portion transmembranaire et la boucle extracellulaire. L'analyse des structures a permis également de relever la présence d'un coude- β pour le segment Q285-L288. Ceci suggère que la conformation des domaines structuraux, en solution, ne se limiterait pas uniquement à des hélices- α . En effet, les coudes- β , qui sont très près de la frontière les séparant de l'hélice 3_{10} , sont stabilisés

également par des interactions à courte distance impliquant des résidus successifs (167). Il est possible que la présence simultanée du TM-VI et du TM-VII pourrait favoriser le repliement de la boucle en ancrant celle-ci dans la micelle et ainsi influencer sa structure en coude- β . Nous interprétons donc la présence de ce coude- β avec prudence car nous ne disposons pas de suffisamment de données pour établir avec certitude que cet élément structural est bel et bien présent dans la structure native de UT. Néanmoins, il est clair que ces résidus ont la propension d'adopter une structure stable ayant des caractéristiques proches de l'hélice 3_{10} . En comparant la structure globale de EC-III au domaine correspondant dans le modèle de la rhodopsine, nous pouvons constater des similitudes au niveau de l'extrémité C-terminale, mais plus de divergences pour le côté N-terminal. La comparaison semble montrer que plusieurs résidus au niveau de l'extrémité N-terminale de EC-III, correspondant au TM-VI, sont absents ce qui est en accord avec nos résultats (Figure 21). De plus, le coude- β identifié dans EC-III n'est pas présent au niveau de la structure de la rhodopsine qui présente plutôt un segment étendu.

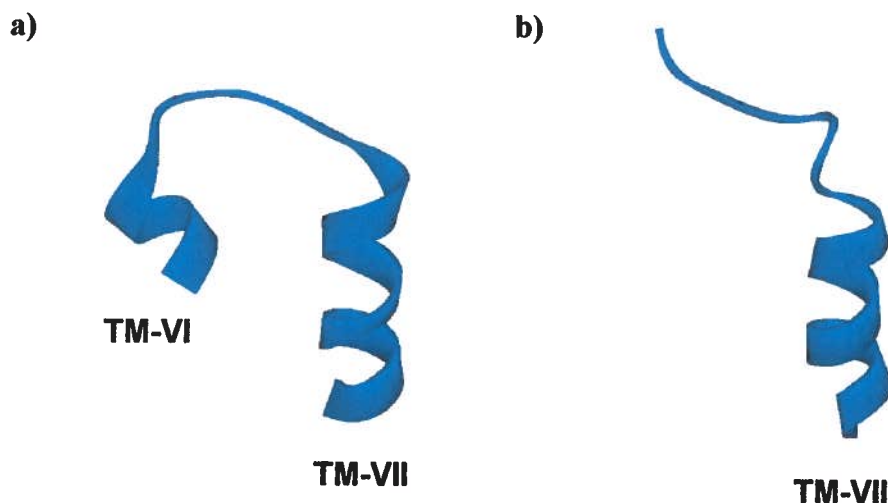


Figure 21. Comparaison de la structure tridimensionnelle de a) la rhodopsine bovine déterminée par rayon-X (188.pdb) et de b) la structure de EC-III déterminée par RMN.

L'étude structurale par RMN du peptide synthétique EC-III or (A281-T300) a été réalisée dans un mélange eau/micelles de dodécylphosphocholine (DPC), milieu mimant la membrane. L'analyse a permis de mettre en évidence des différences structurales entre la structure de EC-III et le domaine structurale correspondant à la rhodopsine.

RMN et modélisation moléculaire de EC-II

Les résultats provenant de la RMN et de la modélisation moléculaire sous contraintes RMN de EC-II n'ont pas été publiés dans le cadre du second article. Cette section est donc dédiée à la présentation des résultats de l'étude structurale menée sur EC-II qui serviront de base pour un prochain article.

La méthodologie utilisée a été la même que celle détaillée dans le second article et EC-II a été analysé sous les mêmes conditions d'acquisition que pour EC-III. Dans un premier temps, tous les systèmes de spin des résidus ont été identifiés (voir table des déplacements chimiques en annexe) selon la méthode classique utilisant l'attribution séquentielle (168). Tout comme pour EC-III, nous avons relevé une forme minoritaire pour l'ensemble des signaux de EC-II. Ces signaux représentent moins de 15% par rapport à la forme majoritaire. L'existence de quatre prolines dans ce peptide contribue probablement à la présence de ces formes minoritaires dues à une isomérisation. Cependant, la présence de signaux forts $H\alpha_i/H\delta_i+1(\text{pro})$ confirme la conformation trans de toutes les prolines. Par ailleurs, l'analyse de EC-II dans un ratio micelle/peptide différent a permis de déterminer qu'une partie de la forme minoritaire est causée par un échange lent entre les formes liées et non-liées à la micelle. Nous avons donc utilisé la forme majoritaire pour effectuer l'attribution. Nous avons, entre autres, mesuré les déplacements chimiques secondaires de tous les $H\alpha$ pour ainsi obtenir un aperçu qualitatif de la nature de la structure secondaire de EC-II (Figure 22). Ces données suggèrent la présence de deux hélices, la première entre les résidus V184 et R192, et la seconde entre les résidus R206 et L212. Ces résultats sont en accord avec nos prédictions voulant la présence de deux segments hélicoïdaux correspondants aux portions des TM-IV et TM-V situées aux extrémités N- et C-terminale respectivement. Contrairement à EC-III, les résultats suggèrent que le centre du domaine adopte une conformation aléatoire. L'étape suivante a consisté à identifier et à quantifier tous les NOEs afin d'élaborer un jeu de contraintes. Au total, 420 effets Overhauser (76 intra, 154 séquentiels et 76 mediums/longs et 114 ambigus) ont été ainsi identifiés permettant l'élaboration d'environ une dizaine de contraintes par résidu. Ces contraintes sont partiellement illustrées dans le diagramme de connectivité (Figure 23). Mais, le nombre

de contraintes n'est pas uniforme sur l'ensemble de la structure. Les résultats expérimentaux indiquent que les extrémités N et C terminales sont plus structurées. La présence de nombreux NOEs de type $d_{\alpha,N}(i, i+4)$, $d_{\alpha,N}(i, i+3)$ et $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ dans la région N-terminale suggère une hélice entre les résidus P183 et R192. Les NOEs du côté C-terminal suggèrent une seconde hélice, plus courte, débutant avec le résidu P205. Cependant, la présence d'un nombre significatif de contraintes ambiguës, principalement causées par des superpositions au niveau des spectres, est une entrave pour la détermination de l'extrémité précise de l'hélice. Cependant, celle-ci semble être délimitée par les résidus P205 et A210.

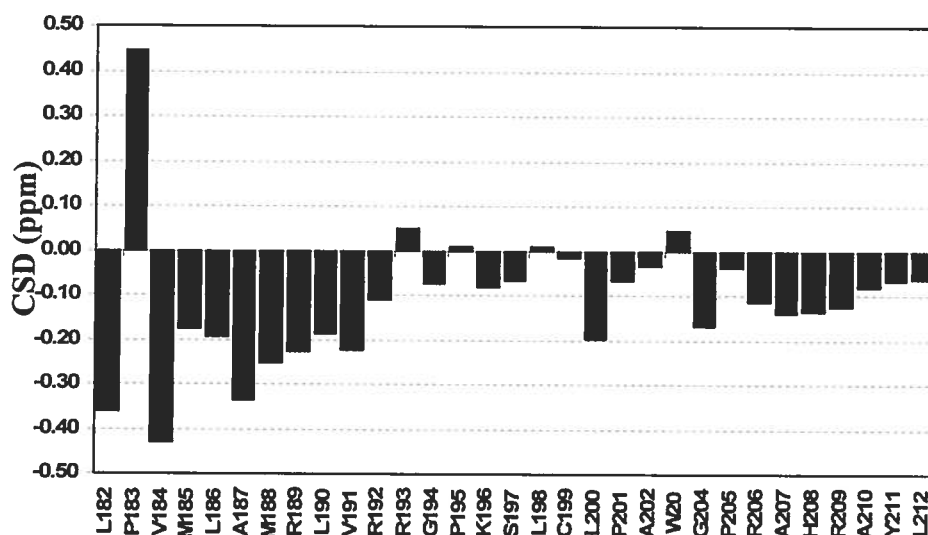


Figure 22. Tableau des déplacements chimiques secondaires de EC-II dans le DPC à 313K.

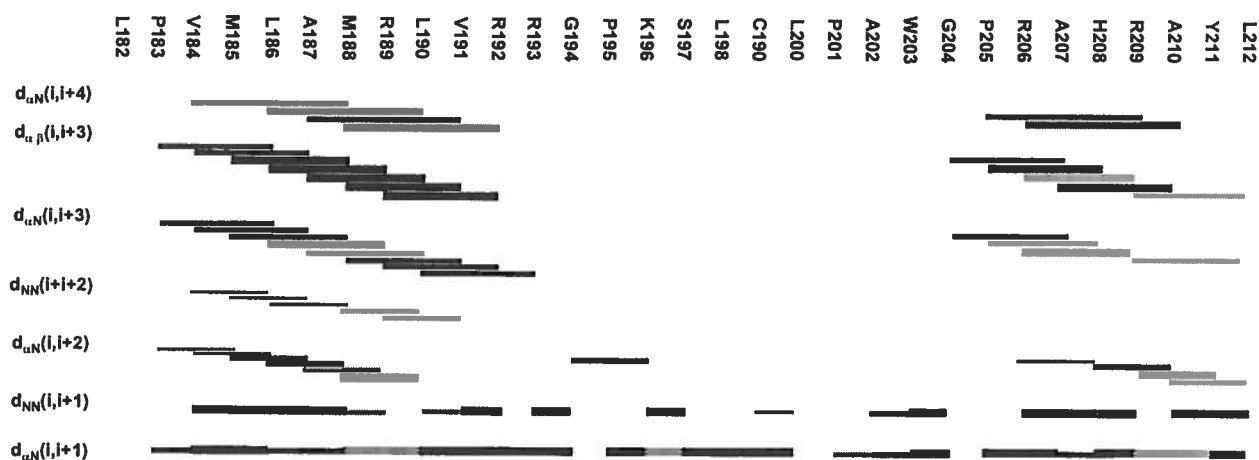


Figure 23. Diagramme de connectivités NOEs de EC-II dans le DPC à 313K.

L'analyse de paramètres structuraux (indices de déplacement chimique, NOEs) indique l'existence d'une hélice stable dans la région C-terminale du peptide (P183-R192) et suggère l'existence d'une hélice naissante dans la région P205-Y211.

À partir du jeu de contraintes, 100 structures ont été calculées en suivant un algorithme de recuit simulé dans CNX et raffinées dans CHARMM22. Malgré qu'aucune incohérence géométrique supérieure à 0.2Å n'ait été observée, seules 60 de ces structures ont été sélectionnées sur la base du diagramme de Ramachandran et de la distribution des angles Φ et Ψ . Le détail des statistiques structurales est présenté en annexe. L'analyse des angles (i.e. Φ et Ψ) a permis d'identifier les segments 183-192 (figure 24a) et 205-209 (Figure 24b) comme deux segments présentant des valeurs de convergence de $\langle \text{RMSD} = 0.21\text{\AA} \rangle$ et de $\langle \text{RMSD} = 0.18\text{\AA} \rangle$. Les angles et la présence de NOEs (i, i+2) montrent que l'hélicité est partiellement de type 3_{10} , probablement en équilibre avec une hélice- α (figure 24). Ces résultats sont en accord avec la présence d'un plus grand nombre de contraintes structurales pour les deux segments 183-192 et 205-209 (Figure 25). De plus, un bon nombre de liaisons hydrogènes ont été relevées au niveau des ces segments supportant la nature de l'hélicité (Annexe). La structuration des résidus est imparfaite aux extrémités à cause d'un effet de bord. Aucun NOE n'a été observé pour la région charnière, plus précisément par le segment 193-204 reliant les deux hélices. L'analyse des angles Φ et Ψ de cette région charnière montre une grande dispersion des valeurs ce qui signifie que les résidus 193-204 subissent des mouvements significatifs dans une échelle de temps très courte.

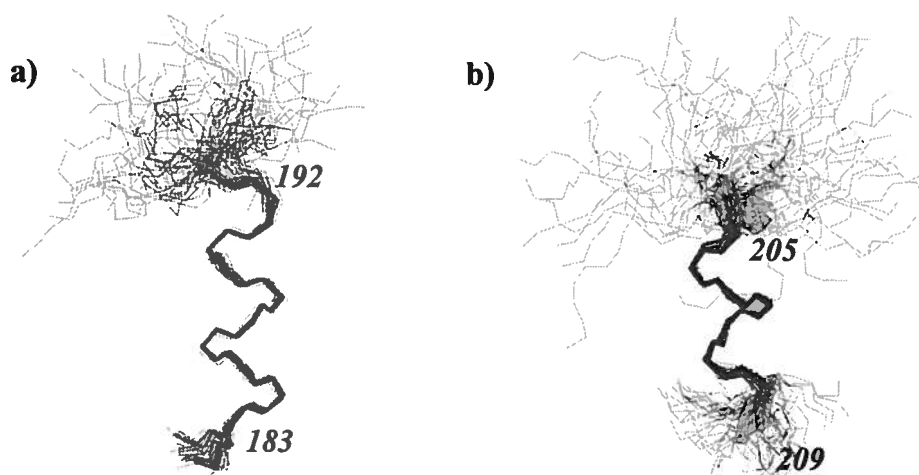


Figure 24. Superposition des atomes N, C α , C' du squelette EC-II entre les segments hélicoïdaux constitués par les résidus a) 183-192, et b) 205-209.

Seuls les résidus a) 183-200 et b) 198-211 sont illustrés.

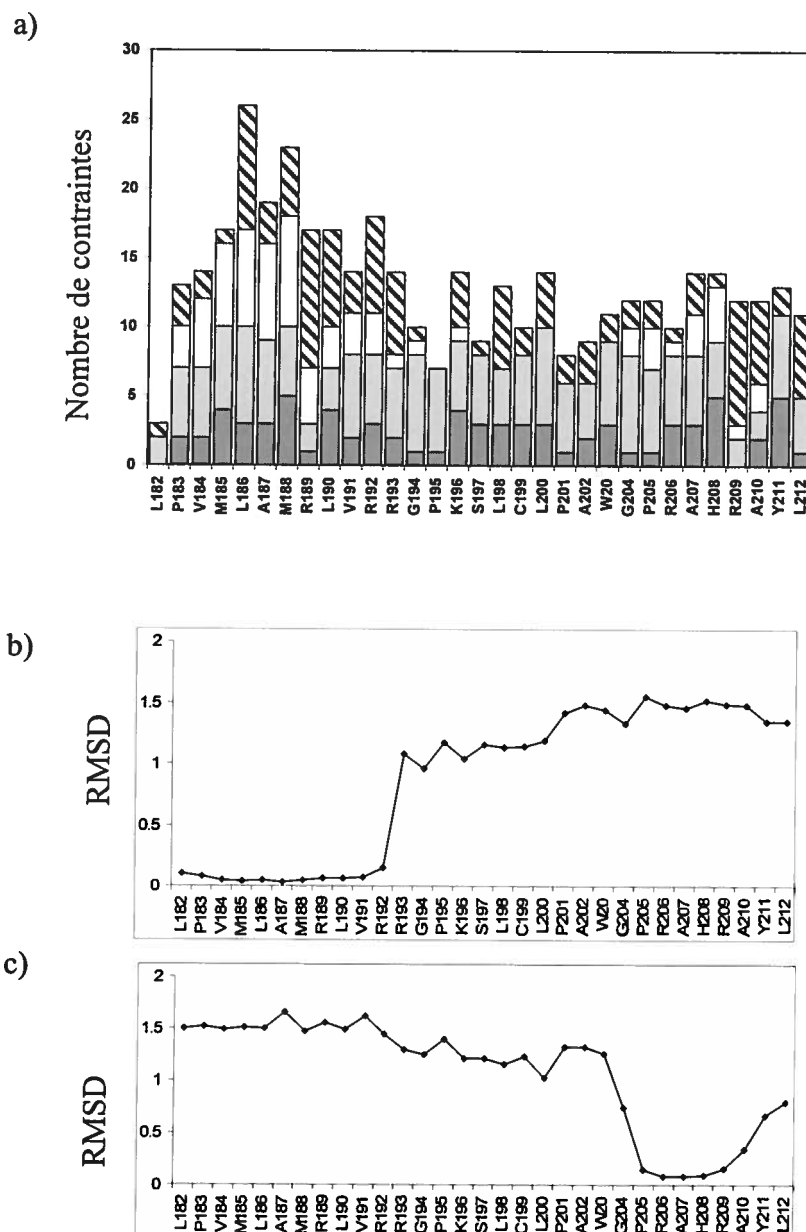


Figure 25. Distribution des NOEs et du RMSD pour EC-II.

La distribution des NOEs pour chaque résidu se décrit ainsi : intrarésidu (gris foncé), séquentiel (gris), medium-longue portée (blanc), et ambiguë (ligné). La moyenne du RMSD est déterminée en superposant les atomes C, C α , C des résidus b) P183-R192, et c) P205-R209 des structures obtenues avec la structure idéale.

Les domaines hélicoïdaux 183-192 et 205-209 correspondent aux domaines transmembranaires-IV et -V respectivement. Cependant, la structure déterminée expérimentalement diffère des modèles bioinformatiques au niveau de la délimitation de ces hélices transmembranaires et suggère que les hélices ne se limiteraient pas au niveau des domaines transmembranaires. En effet, tout comme démontré pour EC-III, nos résultats suggèrent que les caractères hélicoïdaux des portions du TM-IV et TM-V seraient plus prononcés que ce qui a été établi à partir de nos prédictions. Ainsi, elles se propageraient au-delà des domaines TM, tout particulièrement dans le cas du TM-IV. Par contre, le fait que le centre de la boucle soit désordonné confère à ce domaine une grande liberté de mouvement ce qui est en accord avec l'hypothèse que le domaine EC-II pourrait en fait couvrir le centre du récepteur et le site de liaison. La comparaison de la structure globale de EC-II avec la structure de la seconde boucle extracellulaire de la rhodopsine présente des différences importantes (Figure 26). En effet, dans le modèle de la rhodopsine, le TM-IV est court et le TM-V est long. Or, le modèle de EC-II obtenu possède un TM-IV long et un TM-V court. De plus, le centre du domaine EC-II est désordonné contrairement au domaine équivalent dans la rhodopsine qui adopte plutôt un feuillet- β . L'inconvénient des modèles déterminés par rayons-x est qu'ils ne permettent pas d'obtenir d'information sur la flexibilité que pourraient avoir certains domaines dont les boucles cellulaires, et plus particulièrement les boucles extracellulaires. En effet, l'évaluation des valeurs de RMSD des domaines extracellulaires de la rhodopsine selon tous les pdb disponibles, est uniquement de 0.1Å, contrairement aux domaines intracellulaires où les pdb diffèrent beaucoup plus au niveau de leur structure. Cependant, comme mentionné lors de l'analyse structurale de EC-II, d'autres publications portant sur le récepteur α 2-adrénergique (169) et le récepteur κ -opioïde (43) démontrent des différences structurales significatives comparativement à la structure de la rhodopsine, tant au niveau des TMs que des boucles. Ceci remet partiellement en doute l'utilisation de ce récepteur comme modèle pour la modélisation moléculaire par homologie.

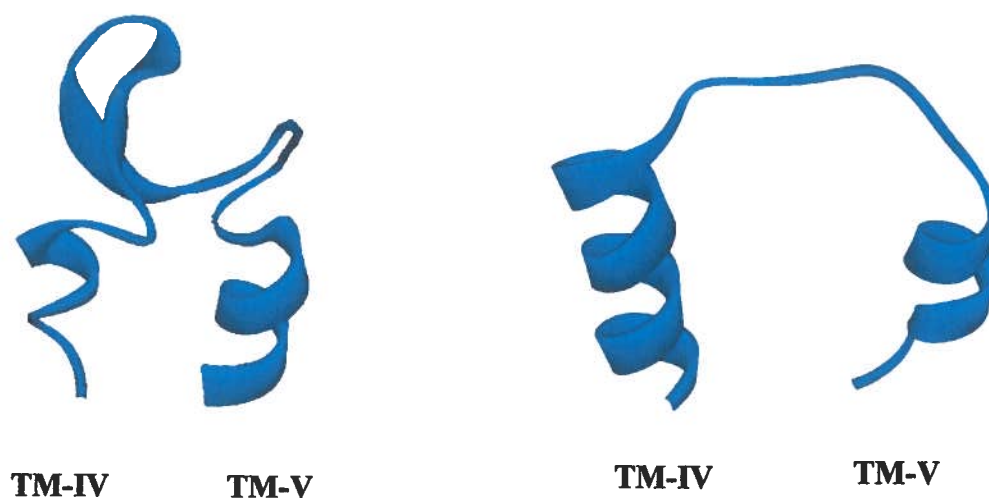


Figure 26. Comparaison de la structure tridimensionnelle de a) la rhodopsine bovine déterminée par rayon-X (188.pdb) et de b) la structure de EC-II déterminée par RMN.

L'étude structurale par RMN du peptide synthétique EC-II a été réalisée dans un mélange eau/micelles de dodécylphosphocholine (DPC), milieu mimant la membrane. L'analyse a permis de mettre en évidence des différences structurales entre la structure de EC-II et le domaine structurale correspondant à la rhodopsine particulièrement au niveau de la limite des hélice- α définissant les domaines transmembranaires.

Conclusion sur la structure EC-II et EC-III

Les structures présentées par EC-II et EC-III montrent la stabilité en solution de certains des domaines transmembranaires (Figure 27). Nos résultats suggèrent donc que la structure des domaines transmembranaires telle qu'observée pour le TM-IV(EC-II), le TM-V(EC-II) et le TM-VII(EC-III) est directement guidée par des interactions à courte distance dictées par la séquence primaire. Ceci est cohérent avec le fait qu'il est accepté que les structures en hélice ou en coude dépendent des résidus voisins. Des études ont montré que des peptides mimant des domaines transmembranaires peuvent former des hélices- α (39, 170) et des coudes- β (38, 49, 151) indépendamment du reste de la protéine. Cependant, le motif hélice-coude-hélice attendu pour EC-II et EC-III est absent pour l'ensemble des structures. Ceci suggère que les interactions de courte distance stabilisant ce type de structure ne sont pas, dans notre cas, observées ou sont en nombre

suffisant pour stabiliser la formation du coude, surtout pour ce qui est de EC-II. Ainsi, la présence de plus longs domaines transmembranaires aurait probablement contribué à former des interactions de longue distance plus structurantes entre les domaines transmembranaires et ainsi favoriser la formation d'une boucle. De plus, nous pouvons penser que l'ajout d'un élément contraignant les extrémités des boucles, tel un pont disulfure, aurait pu favoriser le repliement correct des boucles EC-II et EC-III et contribuer à la formation au centre même de la boucle d'un élément structural en épingle à cheveux de type β . Des segments de RCPGs, dont le récepteur de la prostacycline (171) et le récepteur du thromboxane A2 (130), ont déjà été étudiés sous leur forme cyclique faisant appel à l'ajout de deux résidus homocystéines placés à chacune des extrémités des peptides. Le pont disulfure résultant d'une liaison entre les chaînes latérales des homocystéines a permis de restreindre l'ouverture des boucles ($\approx 13\text{\AA}$) afin de la garder voisine de la valeur retrouvée dans la structure de la rhodopsine (Figure 28). De même, une autre équipe a synthétisé un peptide correspondant à une boucle extracellulaire en ajoutant à chaque extrémité du peptide un résidu cystéine (CysGly- et -GlyCys) comme élément contraignant (118). Par contre, ils ont aussi observé par CD que le peptide adopte sous sa forme cyclique ou linéaire une conformation aléatoire. Ils ont ensuite poursuivi l'analyse structurale par RMN et montré pour la forme cyclique la présence d'un coude. Quoique l'ajout d'un élément chimique ayant pour but de contraindre les peptides semble contribuer à stabiliser la formation du coude, celui-ci n'est pas absolument nécessaire puisque sans pont disulfure, la boucle extracellulaire-III (28aa) du récepteur de la cholécystokinine A en solution adopte une conformation en épingle à cheveux de type β (45).

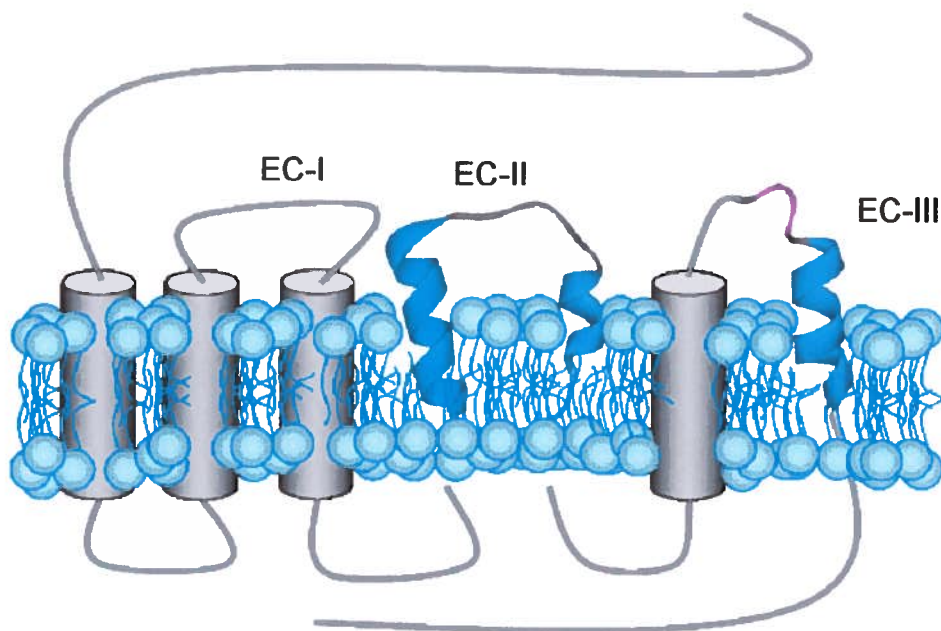


Figure 27. Représentation mixte du récepteur UT construit à l'aide des données expérimentales provenant de l'analyse structurale par RMN de EC-II et EC-III.

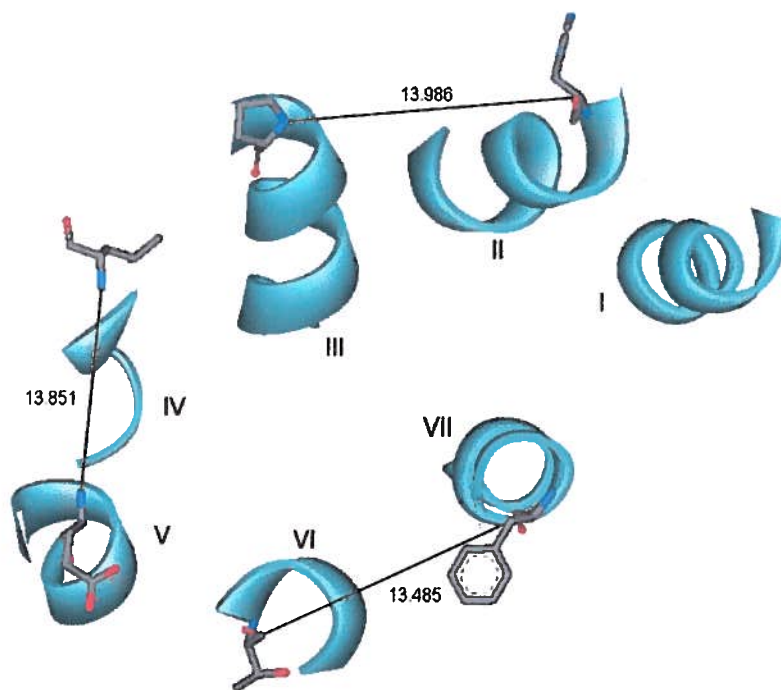


Figure 28. Représentation de la structure partielle des domaines transmembranaires de la rhodopsine bovine (1F88.pdb) et de la distance les séparant.

Seul les domaines transmembranaires sont représentés. La distance séparant le sommet des TMs a été mesurée en Å du côté extracellulaire de la membrane.

3.2.3 Étude d'interactions par RMN

Les récepteurs RCPGs sont formés de 7 hélices transmembranaires reliées par des boucles intra- et extracellulaires. Ces 7 hélices sont reconnues pour délimiter une cavité au centre du récepteur. Le mécanisme classique d'activation est décrit par la fixation d'un ligand soit à l'intérieur de cette cavité, soit au niveau des boucles extracellulaires, stabilisant le récepteur dans sa forme active et initiant une cascade de réactions chimiques. Le site de liaison des RCPGs peut donc être situé au sein des segments transmembranaires et/ou à la surface externe de la membrane. Puisqu'une plus grande diversité se retrouve au niveau des boucles extracellulaires, notamment par la nature des résidus et la taille des boucles, il est probable que cette diversité soit à l'origine de la sélectivité des ligands. En accord avec cette hypothèse, plusieurs résidus présents au niveau des TMs sont hautement conservés d'une espèce à l'autre; ceux-ci rempliraient un rôle alors au niveau d'un mécanisme commun de liaison et/ou d'activation du récepteur.

Les interactions intermoléculaires sont un aspect très important de l'action des ligands sur les RCPGs. Or, l'interaction entre deux peptides peut être étudiée par titrage par RMN 2D. En effet, par l'enregistrement de données à différents rapports de concentration pour les deux molécules, il est possible d'évaluer l'arrangement spatial de leur interaction en suivant les variations des déplacements chimiques. Ces études apportent de nouvelles connaissances de ces interactions d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Dans le but d'établir un schéma d'interaction ligand-récepteur pour le récepteur UT, nous avons fait usage de cette technique afin d'étudier l'effet de la présence de U-II sur l'environnement des résidus composant EC-III. Ainsi, dans le cadre du second article, nous avons entrepris une analyse détaillée de la structure de EC-III et cherché à caractériser les réseaux d'interactions mis en jeu dans les complexes EC-III/U-II. Pour ce faire, nous avons réalisé le titrage par RMN du complexe EC-III/U-II dans les mêmes conditions utilisées pour la modélisation, soit un environnement micellaire (DPC- d_{38}). L'utilisation de micelles ne remplace pas, mais complète les exigences du récepteur pour une interaction ligand-récepteur. Lors du titrage par RMN de EC-III en présence de

U-II, plusieurs résidus de EC-III s'avèrent être perturbés comparativement aux spectres de référence. Les plus importantes perturbations enregistrées se situaient aux endroits suivants : H284, Q285, A289, T292, A293, V296, N297, L299 et T300 (article 2). De plus, ces perturbations variaient en fonction de la concentration ce qui suggère que ces résidus sont impliqués ou se retrouvent dans l'environnement immédiat du site de liaison. Une étude complémentaire appliquant le titrage de U-II par EC-III a permis d'observer que certains résidus de U-II sont également affectés par la présence de EC-III. Les plus grandes variations ont été observées pour les résidus suivants du peptide U-II: D4, F6, W7, C10 et V11 (article 2). Certains de ces résidus dont F6 et W7 ont été identifiés dans plusieurs études de SAR comme élément clef à la liaison et à l'activité de U-II (99, 101, 102, 109). Nos résultats suggèrent que ces deux résidus pourraient en fait interagir avec la boucle extracellulaire III de UT. Compte tenu de la nature de ces résidus, nous pouvons postuler une interaction hydrophobe avec certains résidus de EC-III, tels V296 ou L299. De plus, la présence de faibles NOEs intermoléculaires entre D4 de U-II et L288 de EC-III confirme la proximité de l'interaction entre EC-III et U-II (article 2). Fait intéressant, ce résidu leucine est conservé chez toutes les isoformes de UT ce qui suggère que ce résidu pourrait faire partie du site de liaison commun. Cette hypothèse est appuyée par une étude récente qui démontre à l'aide du photomarquage l'implication de la troisième boucle extracellulaire dans le complexe U-II / rat UT (90). Ainsi, la titrage par RMN est en accord avec les résultats de RPS qui avaient décrit la présence d'interactions entre EC-III et U-II (article 1). Cependant, la titrage par RMN précise les résidus impliqués dans le processus de liaison. De plus, l'identification de ces résidus en combinaison avec l'élucidation de la structure de EC-III permet de générer de nouvelles hypothèses sur la nature du complexe. En effet, tous les résidus impliqués dans le processus de liaison sont situés dans la région structurée hélicoïdale de EC-III. Bien que les structures résolues de EC-III correspondent à la forme non-complexée du domaine structural, les résultats de la modélisation ont permis de vérifier que ces résidus exposent leur chaîne latérale vers un même côté de la molécule de manière à permettre une interaction avec U-II. Puisque peu de variations ont été observées dans les NOEs structurants de EC-III lors du titrage, il est probable que EC-III adopte une conformation similaire dans ses formes non-complexée et complexée. Ces analyses fournissent des informations pertinentes sur les résidus

impliqués dans le mécanisme de liaison du récepteur UT et démontrent bien l'importance de la troisième boucle extracellulaire de UT pour la liaison de U-II.

Nous avons également exploré le complexe EC-II/U-II en utilisant la même stratégie visant à évaluer l'impact de la présence croissante de U-II sur les signaux de EC-II. L'analyse des spectres a permis de constater que EC-II et U-II se reconnaissent dans le milieu micellaire. En effet, nous avons observé que les résidus R209 et L212 subissent des variations de déplacement chimique et noté l'apparition d'une deuxième forme visible sur les spectres NOESY pour les résidus V184, M185, R189, V191, R192, S197, W203, R206 et Y211 de EC-II (Figure 29 et 30). Cependant, la présence d'équilibres multiples observés dans les spectres (échange rapide et échange plus lent) ainsi que la présence de plusieurs formes minoritaires rend l'interprétation directe trop difficile pour conduire à des conclusions claires. Une étude RMN plus complète (titrage EC-II/U-II et U-II/EC-II précis ainsi qu'un examen fin des formes minoritaires de EC-II en présence de DPC) s'avérerait donc nécessaire pour préciser le rôle des résidus dans le processus de liaison avec U-II. Faute de temps et de matériel ces analyses complémentaires n'ont pu être réalisées dans le cadre de cette Thèse, mais continueront de faire l'objet des activités de recherche du laboratoire des Drs Davoust et Fournier. Néanmoins, ces résultats préliminaires sont encourageants car l'addition de U-II à EC-II semble perturber certains résidus dont ceux à la frontière de la membrane/milieu extracellulaire. Dans l'éventualité où ces données sont confirmées, ces résultats appuieraient les résultats obtenus par une équipe de Sherbrooke qui a montré, au moyen d'analogues photosensibles de U-II, des points d'interaction avec rUT impliquant des résidus situés dans la partie supérieure du domaine transmembranaire-IV (89, 90). Puisque l'isoforme UT de rat partage plus de 90% de similitude au niveau de la séquence avec l'isoforme UT humaine, il est possible qu'il existe un mécanisme commun de liaison. Ceci supporterait l'hypothèse que les boucles extracellulaires possèderaient partiellement les déterminants de liaison nécessaires pour accommoder les pharmacophores de U-II. D'ailleurs, Kaupmann *et al.* ont postulé que le domaine de liaison du récepteur SST2, qui partage une homologie structurale de 41% avec le récepteur UT, est exclusivement contenu entre les domaines transmembranaires III à VII

(108). La présence d'une grande homologie de séquence au niveau des TMs de la somatostatine et de UT suggère que l'hétérogénéité des domaines extracellulaires prend son importance du fait qu'ils doivent lier des ligands différents. Ainsi, les domaines transmembranaires pourraient occuper un rôle de charpente structurale pour soutenir l'activation des RCPGs selon un arrangement bien déterminé. Les ligands peptidiques en interagissant à la fois avec les domaines extracellulaires et transmembranaires, rigidifieraient le récepteur UT dans sa conformation active. Ainsi, des résidus situés à l'interface des domaines transmembranaires et des boucles extracellulaires, tel qu'observé pour EC-III, pourraient constituer le site de liaison de U-II. Cette hypothèse est en accord avec les différents modèles du complexe U-II/UT obtenus par modélisation moléculaire proposant une cavité au centre de UT qui placerait U-II à l'interface des différents domaines transmembranaires faisant face au côté extracellulaire (101, 120). Un modèle similaire a été proposé pour le récepteur SST2 (108).

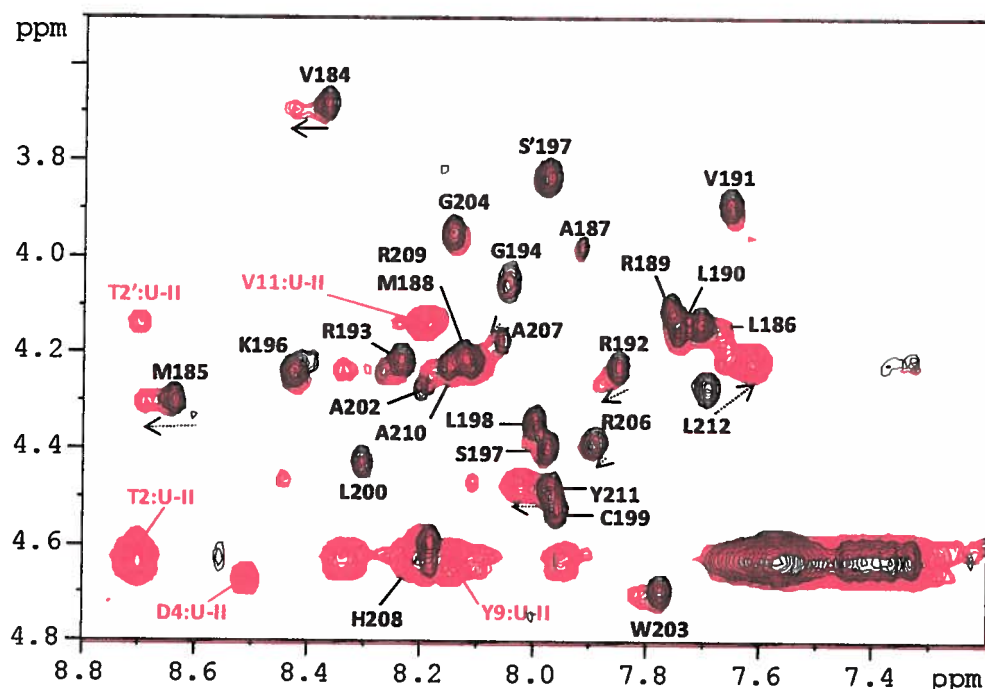


Figure 29. Superposition des spectres TOCSY de EC-II sous sa forme libre (contour noir) et de EC-II/U-II (contour rouge) lors du titrage.

Seul le spectre correspondant au ratio (1:0.8) est présenté pour une meilleure clarté. Les résidus pour lesquels un déplacement chimique significatif est observé sont indiqués par une flèche. Le nom des résidus identifiés en noir appartiennent à EC-II et en rouge à U-II.

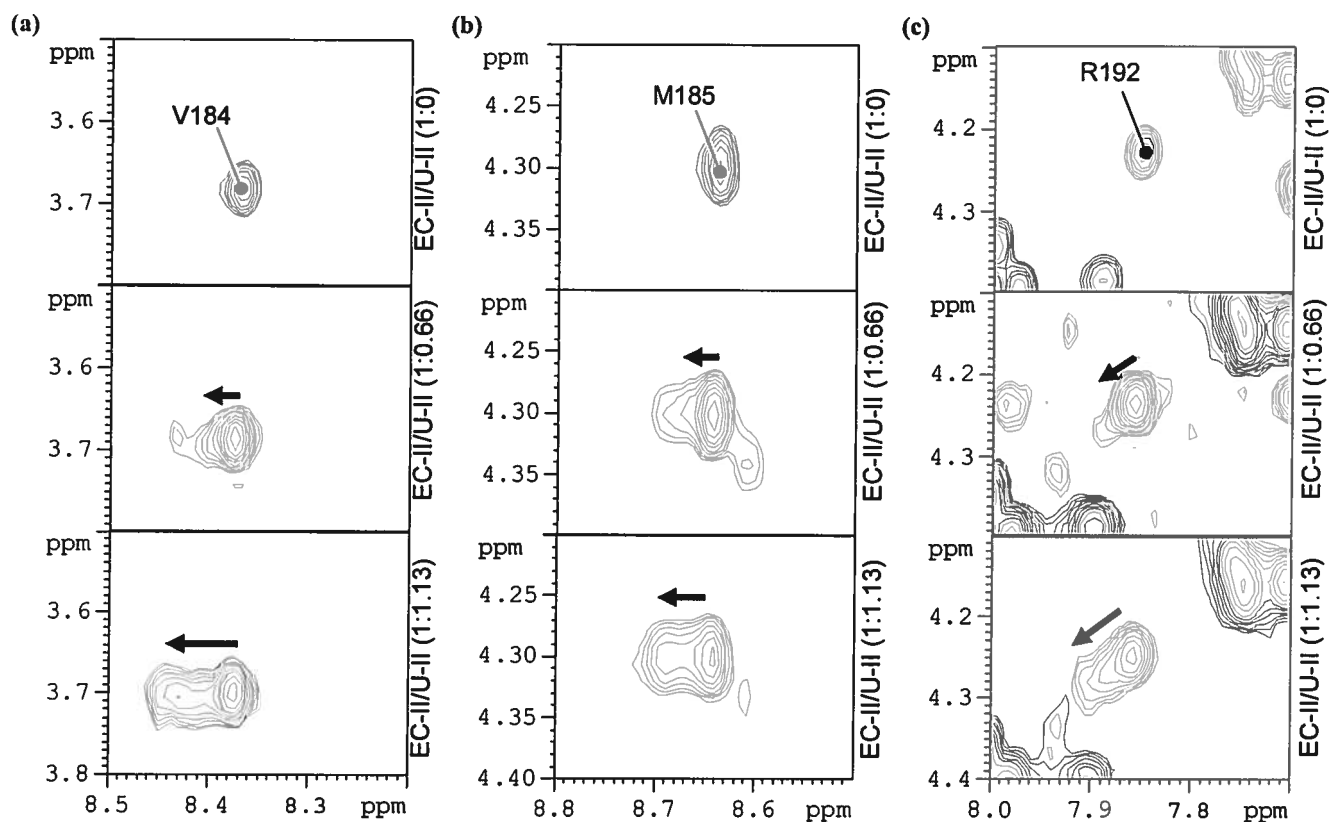


Figure 30. Agrandissement de la région correspondant au HN- H_{α} du spectre TOCSY lors du titrage EC-II/U-II pour les résidus a) V184, b) M185 et c) R192.

La présence d'équilibres multiples observés dans les spectres (échange rapide et échange plus lent) a été remarqué lors de la titration EC-II/U-II ce qui rend l'interprétation directe trop difficile pour conduire à des conclusions claires.

3.3. Conclusion

Les mécanismes de reconnaissance entre les ligands et leurs récepteurs sont à la base du fonctionnement cellulaire. La compréhension de ces mécanismes constitue un défi majeur pour la biochimie. L'élucidation des relations structure-fonction impliquées dans la reconnaissance des ligands, dans l'activation des récepteurs, dans la cascade de la signalisation, et dans les phénomènes de désensibilisation est essentielle pour s'attaquer efficacement à certaines pathologies.

Cinq domaines structuraux du récepteur UT (EC-I, EC-II, EC-III, TM-III et le TM-IV) ont été synthétisés et analysés par RPS pour évaluer leur capacité à interagir avec différents ligands sélectifs du récepteur UT. Ceci nous a permis d'identifier le domaine extracellulaire-II comme site de liaison de l'urotensine-II, de l'URP et le domaine extracellulaire-III comme élément clef pour la liaison de l'urotensine-II, de l'URP et de l'antagoniste urantide. Malgré une constante d'affinité faible, les caractéristiques de ces deux domaines suggèrent fortement un rôle pour les boucles extracellulaires dans le mécanisme de liaison de l'UT. Pour s'associer spécifiquement aux ligands, ces domaines doivent avoir une topographie qui est chimiquement complémentaire au ligand et satisfaire les exigences spatiales pour une telle liaison. À l'aide du dichroïsme circulaire, nous avons confirmé la propension de l'ensemble des domaines de UT à adopter une conformation stable dans plusieurs milieux. Entre autres, le caractère hélicoïdal de EC-II et EC-III pourrait être un élément structural essentiel pour la reconnaissance de ligands de UT. L'étude structurale par RMN a quant à elle permis de caractériser la structure de EC-II et EC-III et de préciser la frontière des structures moléculaires hélicoïdales des segments TM-IV, TM-V et TM-VII. Ainsi, notre étude suggère que la structure secondaire, particulièrement au niveau des domaines transmembraines, est dictée par des interactions de courte distance directement guidées par la séquence. Nous avons également caractérisé par titrage RMN le complexe EC-III/UT en identifiant clairement les déterminants de l'interaction dans un environnement micellaire. De plus, nous présentons les résultats préliminaires du titrage du complexe EC-II/UT, lesquels

suggèrent un rôle probable pour les domaines TM-III et TM-IV dans la liaison de U-II. Ainsi, notre hypothèse selon laquelle les boucles extracellulaires participent à la liaison de U-II a été explorée par deux différentes méthodes, soit la RPS et la RMN. Ces données permettent de mieux comprendre l'importance des domaines EC-II et EC-III et procurent de nouvelles données pouvant servir au raffinement du modèle global de UT par homologie. De plus, de façon générale, notre étude contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance hormone-récepteur et du fonctionnement en général des RCPGs.

3.4. Contribution à l'avancement des connaissances

Il existe un réel intérêt pour l'étude des RCPGs en général. Ceux-ci, par leur complexité et leur diversité, constituent la clef de plusieurs fonctions biologiques, et de ce fait, peuvent contribuer à l'étiologie de plusieurs pathologies. Les interactions ligand/récepteur ne sont qu'une facette des sujets de recherche et des travaux effectués visant à comprendre le mécanisme de liaison. Ces études sont importantes pour le développement d'outils moléculaires pour la caractérisation des différents systèmes biologiques qui mèneront par la suite au développement et/ou au raffinement de molécules thérapeutiques. L'étude du système urotensine-II présente un intérêt certain pour une meilleure compréhension du système cardiovasculaire et des pathologies qui y sont associées. Malgré des efforts soutenus pour développer des outils automatisés pour identifier les structures des RCPGs et de leur site de liaison, seules les études axées sur l'identification des pharmacophores ont fourni pour l'urotensine-II une base afin d'émettre des hypothèses sur la cartographie du site de liaison de UT.

Le travail de cette thèse ainsi que les deux articles présentés apportent des données expérimentales sur le rôle et la structure des domaines extracellulaires impliqués dans le site de liaison de l'urotensine-II. La stratégie utilisant la RPS pour évaluer la capacité de domaines structuraux de RCPGs à interagir avec différents ligands est

originale et s'est montrée très efficace. De plus, l'utilisation de la RMN pour étudier les RCPGs demeure des plus pertinentes et représente un grand défi. L'élucidation de la géométrie de ces récepteurs par des méthodes alternatives utilisant par exemple l'étude individuelle des domaines structuraux, gagne en popularité, particulièrement avec l'accroissement des banques de données structurales et le développement de la RMN à haute résolution. Récemment une première publication a fait mention de l'attribution complète d'un RCPGs par RMN ce qui encourage l'utilisation de cette technologie pour l'étude structurale de ces récepteurs. Donc, notre travail s'inscrit dans un effort collectif de caractériser la structure des RCPGs. Plus particulièrement, la caractérisation des boucles extracellulaires-II et -III de UT représente également un intérêt certain pour le raffinement des modèles de UT obtenus par modélisation par homologie. En effet, la grande flexibilité de ces domaines extracellulaires rend leurs structures difficilement prédictibles. Ainsi, l'identification d'un coude- β et la délimitation de structures en hélice appartenant aux domaines TM-IV, TM-V et TM-VII au sein de EC-III, ainsi que la caractérisation des déterminants de cette boucle extracellulaire contribueront au raffinement des modèles de UT.

3.5. Perspectives

Les maladies cardiovasculaires constituent la cause principale de mortalité dans les pays industrialisés. Une meilleure connaissance du système urotensinergique est donc une priorité. La conception de ligands agonistes et antagonistes de UT devrait permettre à long terme de développer des applications thérapeutiques pour le traitement de certaines pathologies cardiovasculaires, neuromusculaires et/ou endocriniennes. Nos résultats par RPS ont montré que seuls U-II et l'URP, deux agonistes, pouvaient lier EC-II. Ceci suggère que des molécules hautement sélectives pour la seconde boucle extracellulaire d'UT pourraient être développées dans l'optique d'obtenir des molécules antagonistes.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décrit des caractéristiques de EC-II et de EC-III dans la liaison de différents ligands et les éléments déterminants de la boucle extracellulaire-III pour la liaison de U-II: H284, Q285, A289, T292, A293, V296, N297, L299 et T300. Ces résidus composent ainsi une partie du site de liaison de U-II. De plus, nous avons identifié la présence de faibles NOEs intermoléculaires entre D4 de U-II et L288 de UT. Ces données pourraient servir de point de référence pour élaborer un projet de récepteur chimère et/ou de mutagénèse dirigée. En effet, notre étude fournit des données intéressantes qui pourraient servir de guide dans le choix de substitutions de segments ou de résidus appartenant à UT. Ces études contribueraient à mieux caractériser le site de liaison et pourraient évaluer le rôle de ces résidus dans l'activation du récepteur. Par contre, l'hypothèse d'un schéma de liaison commun pour des ligands peptidiques avec leurs RCPGs n'a pas été démontrée. L'élucidation des résidus intervenant dans le mécanisme de liaison des RCPGs aidera à long terme à répondre à cette question et potentiellement à dresser un mode d'interaction commun.

Il y a encore peu de temps, les RCPGs n'étaient vus que comme des entités monomériques. Néanmoins, une dimérisation induite par un agoniste était déjà reconnue comme une étape essentielle pour l'activation des récepteurs des facteurs de croissance et des cytokines (172). Ces dernières années, un nombre croissant de démonstrations biochimiques et biophysiques ont non seulement indiqué que de nombreux RCPGs existent sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère, mais également que ce processus peut jouer un rôle important dans les événements moléculaires qui mènent à l'activation du récepteur. Ce nouveau concept a bouleversé le modèle traditionnel d'interaction entre RCPG et protéine G, qui établissait la stœchiométrie à 1:1. Bien que l'existence des dimères de RCPGs soit aujourd'hui largement acceptée (173-175), ce phénomène pour le récepteur de l'urotensine-II reste à démontrer. Cependant, des données fragmentaires supportent l'hypothèse que UT pourrait effectivement exister sous forme de dimère. Ainsi, U-II a un pouvoir vasodilatateur dix fois plus important que son pouvoir vasoconstricteur, ce qui pourrait résulter d'une différence d'affinité du peptide pour deux récepteurs distincts (176). Cependant, les recherches bioinformatiques n'ont pas permis d'identifier de gènes qui sont plus proches de UT que les récepteurs déjà connus, c'est-à-

dire ceux de la somatostatine, des opiacées et de la galanine. De nos jours, la dimérisation du récepteur de la somatostatine a été démontrée. Puisque ce récepteur présente une forte similitude de séquence avec le récepteur UT, il est probable que le récepteur UT existe également sous forme de dimère. Dans ce cas, une meilleure connaissance structurale du récepteur UT pourrait s'avérer nécessaire pour adapter les modèles existant pour le développement de molécules pharmacologiques et thérapeutiques agissant sur le dimère.

ANNEXE

Tableau des déplacements chimiques des protons de EC-II dans le DPC.

Chemical shift value of assigned proton resonances in the spectrum of EC-II in DPC.					
Residue	Shift of proton resonance (ppm) ^a				
	NH	H α	H β	H γ	Others
L182	-	4.27	1.83	1.83	δ H 0.97 / 0.96
P183		4.87	2.29 / 2.22	2.13 / 2.01	δ H 3.90 / 3.40
V184	8.37	3.69	2.13	1.04 / 0.98	
M185	8.64	4.30	2.14 / 2.06	2.69 / 2.58	
L186	7.71	4.14	1.74 / 1.68	1.66	δ H 0.97 / 0.91
A187	7.91	3.99	1.43		
M188	8.11	4.23	2.18 / 2.10	2.72 / 2.58	
R189	7.76	4.11	1.96	1.82 / 1.70	δ H 3.19; ϵ H 7.44
L190	7.74	4.15	1.86 / 1.61	1.79	δ H 0.90 / 0.86
V191	7.66	3.90	2.22	1.02 / 0.95	
R192	7.85	4.23	1.94 / 1.85	1.76 / 1.67	δ H 3.18; ϵ H 7.39
R193	7.89	4.39	1.97	1.85 / 1.71	δ H 3.19; ϵ H 7.41
G194	8.04	4.06			
P195		4.43	2.27	2.03 / 1.99	δ H 3.69 / 3.61
K196	8.43	4.24	1.88 / 1.81	1.48 / 1.45	δ H 1.69; ϵ H 2.99, HNe 7.58
S197	7.97	4.40	3.84		
L198	8.00	4.35	1.63 / 1.56	1.65	δ H 0.90 / 0.86
C199	7.96	4.53	2.88		
L200	8.31	4.43	1.60 / 1.46	1.60	δ H 0.91 / 0.86
P201		4.35	2.05	1.73 / 1.66	δ H 3.71 / 3.35
A202	8.20	4.29	1.33		
W203	7.78	4.71	3.25		δ 1H 7.27; ϵ 1H 10.52; ϵ 3H 7.48; H η 2 7.04; HZ2 7.41; HZ3 6.95
G204	8.15	3.96			
P205		4.38	2.28	1.98 / 1.91	δ H 3.62 / 3.54
R206	8.24	4.22	1.87 / 1.78	1.64	δ H 3.16; ϵ H 7.36
A207	8.06	4.18	1.32		
H208	8.19	4.59	3.27 / 3.13		δ 2H 7.23; ϵ 1H 8.56
R209	8.13	4.21	1.74 / 1.69	1.53	δ H 3.12; ϵ H 7.33
A210	8.15	4.24	1.29		
Y211	7.96	4.48	3.06 / 2.94		δ H 7.07; ϵ H 6.77
L212	7.69	4.28	1.63	1.62	δ H 0.90

^aRelative to DSS

-Not available

ANNEXE

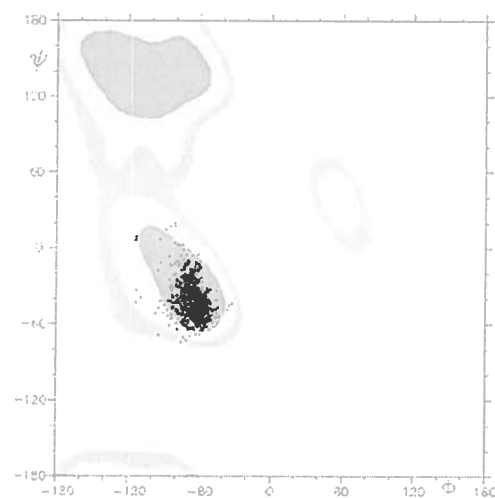
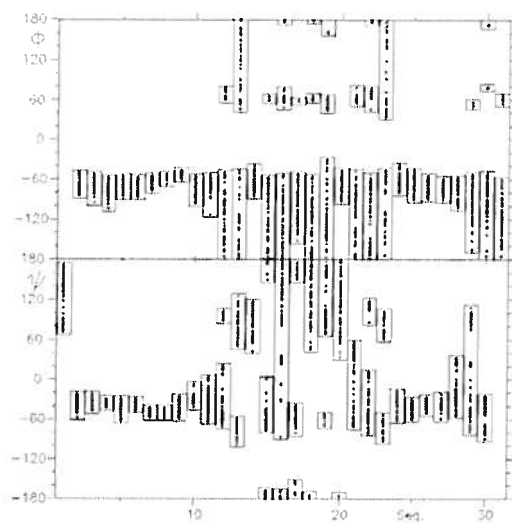


Diagramme de Ramachandran des résidus composant les deux segments hélicoïdaux de EC-II.



Distribution des angles dièdres ϕ et ψ des 60 structures sélectionnées de EC-II.

ANNEXE

Bilan énergétique et structural de l'analyse des 60 structures sélectionnées de EC-II

Statistics for the 60 final structures of hUT(281-300)	
<i>Energic parameters (kcal mol⁻¹)^a</i>	
Bonds	24
Angles	106
Dihedral	161
Improper	3
Van der Waals	-24
Electrostatics	-513
NOE restraint	4
Total energy	-238
<i>Ramachandran plot appearance^b</i>	
<i>Residues considered: 183-192</i>	
Most favoured regions (%)	99.1%
Additionally allowed regions (%)	0.09%
Generously allowed regions (%)	0%
Disallowed regions (%)	0%
<i>Residues considered: 289-299</i>	
Most favoured regions (%)	100%
Additionally allowed regions (%)	0%
Generously allowed regions (%)	0%
Disallowed regions (%)	0%

^a in CHARMM22 force field
^b From PROCHECK-NMR

Description des liaisons hydrogènes ^c observées pour EC-II.			
Residu-1 (HN)	Residu-2 (O)	Structure (%)	Distance (Å)
L186	L182	38	(1.78..2.02)
A187	P183	100	(1.70..2.05)
M188	V184	100	(1.67..1.96)
R189	M185	98	(1.67..2.32)
L190	L186	100	(1.61..2.30)
V191	A187	100	(1.67..1.98)
R192	M188	95	(1.64..2.33)
R193	R189	73	(1.67..2.36)
G194	L190	32	(1.62..2.27)
G194	R192	18	(1.74..2.16)
K196	G194	45	(1.70..2.18)
A207	G204	42	(1.87..2.26)
H208	G204	75	(1.63..2.28)
R209	P205	75	(1.68..2.40)
A210	R206	45	(1.67..2.30)
A210	A207	43	(1.77..2.38)
Y211	H208	25	(1.79..2.38)
Y211	R209	30	(1.73..2.26)

^c données provenant de MolMol

RÉFÉRENCES

- (1) Wilson, S., and Bergsma, D. (2000) Orphan G-protein coupled receptors: novel drug targets for the pharmaceutical industry. *Drug. Des. Discov.* 17, 105-114.
- (2) Schertler, G. F., Villa, C., and Henderson, R. (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362, 770-772.
- (3) Schertler, G. F., and Hargrave, P. A. (1995) Projection structure of frog rhodopsin in two crystal forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11578-11582.
- (4) Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo. J.* 18, 1723-1729.
- (5) Nathans, J., and Hogness, D. S. (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807-814.
- (6) Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., and et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79.
- (7) Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., and Sealfon, S. C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 11, 1-20.
- (8) Kolakowski, L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1-7.
- (9) Fernandez, L. M., and Puett, D. (1996) Identification of amino acid residues in transmembrane helices VI and VII of the lutropin/choriogonadotropin receptor involved in signaling. *Biochemistry* 35, 3986-3993.
- (10) Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J., and Journot, L. (1996) Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 271, 22146-22151.
- (11) Herrada, G., and Dulac, C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90, 763-773.
- (12) Matsunami, H., and Buck, L. B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90, 775-784.
- (13) Dulac, C., and Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206.
- (14) Ji, T. H., Grossmann, M., and Ji, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J. Biol. Chem.* 273, 17299-17302.
- (15) Gether, U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90-113.
- (16) Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular

- modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 103, 21-80.
- (17) Tota, M. R., and 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. *J. Biol. Chem.* 265, 16891-16897.
 - (18) Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K. H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, 899-929.
 - (19) Bayley, H., Huang, K. S., Radhakrishnan, R., Ross, A. H., Takagaki, Y., and Khorana, H. G. (1981) Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2225-2229.
 - (20) Lemke, H. D., and Oesterhelt, D. (1981) Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* 128, 255-260.
 - (21) Mullen, E., Johnson, A. H., and Akhtar, M. (1981) The identification of Lys216 as the retinal binding residue in bacteriorhodopsin. *FEBS Lett* 130, 187-193.
 - (22) Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., Bruinvels, A., and Hibert, M. (1992) Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. *J. Med. Chem.* 35, 3448-3462.
 - (23) Baldwin, J. M., Schertler, G. F., and Unger, V. M. (1997) An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* 272, 144-164.
 - (24) Unger, V. M., Hargrave, P. A., Baldwin, J. M., and Schertler, G. F. (1997) Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.
 - (25) Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailier, J. P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 291, 899-911.
 - (26) Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
 - (27) Meng, E. C., and Bourne, H. R. (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 587-593.
 - (28) Okada, T., Ernst, O. P., Palczewski, K., and Hofmann, K. P. (2001) Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem. Sci.* 26, 318-324.
 - (29) Ballesteros, J., and Palczewski, K. (2001) G protein-coupled receptor drug discovery: implications from the crystal structure of rhodopsin. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4, 561-574.
 - (30) Lu, Z. L., Saldanha, J. W., and Hulme, E. C. (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 140-146.
 - (31) Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K., and Stenkamp, R. E. (2001) Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* 40, 7761-7772.

- (32) Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J., Landau, E. M., and Shichida, Y. (2002) Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5982-5987.
- (33) Shin, N., Coates, E., Murgolo, N. J., Morse, K. L., Bayne, M., Strader, C. D., and Monsma, F. J., Jr. (2002) Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H4 receptor. *Mol. Pharmacol.* 62, 38-47.
- (34) Manivet, P., Schneider, B., Smith, J. C., Choi, D. S., Maroteaux, L., Kellermann, O., and Launay, J. M. (2002) The serotonin binding site of human and murine 5-HT2B receptors: molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 277, 17170-17178.
- (35) Underwood, D. J., Strader, C. D., Rivero, R., Patchett, A. A., Greenlee, W., and Prendergast, K. (1994) Structural model of antagonist and agonist binding to the angiotensin II, AT1 subtype, G protein coupled receptor. *Chem. Biol.* 1, 211-221.
- (36) Mirzadegan, T., Diehl, F., Ebi, B., Bhakta, S., Polsky, I., McCarley, D., Mulkins, M., Weatherhead, G. S., Lapierre, J. M., Dankwardt, J., Morgans, D., Jr., Wilhelm, R., and Jarnagin, K. (2000) Identification of the binding site for a novel class of CCR2b chemokine receptor antagonists: binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle. *J. Biol. Chem.* 275, 25562-25571.
- (37) Albert, A. D., and Yeagle, P. L. (2000) Domain approach to three-dimensional structure of rhodopsin using high-resolution nuclear magnetic resonance. *Methods Enzymol.* 315, 107-115.
- (38) Katragadda, M., Alderfer, J. L., and Yeagle, P. L. (2000) Solution structure of the loops of bacteriorhodopsin closely resembles the crystal structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1466, 1-6.
- (39) Chopra, A., Yeagle, P. L., Alderfer, J. A., and Albert, A. D. (2000) Solution structure of the sixth transmembrane helix of the G-protein-coupled receptor, rhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1463, 1-5.
- (40) Yeagle, P. L., Alderfer, J. L., Salloum, A. C., Ali, L., and Albert, A. D. (1997) The first and second cytoplasmic loops of the G-protein receptor, rhodopsin, independently form beta-turns. *Biochemistry* 36, 3864-3869.
- (41) Katragadda, M., Chopra, A., Bennett, M., Alderfer, J. L., Yeagle, P. L., and Albert, A. D. (2001) Structures of the transmembrane helices of the G-protein coupled receptor, rhodopsin. *J. Pept. Res.* 58, 79-89.
- (42) Arshava, B., Liu, S. F., Jiang, H., Breslav, M., Becker, J. M., and Naider, F. (1998) Structure of segments of a G protein-coupled receptor: CD and NMR analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* tridecapeptide pheromone receptor. *Biopolymers* 46, 343-357.
- (43) Zhang, L., DeHaven, R. N., and Goodman, M. (2002) NMR and modeling studies of a synthetic extracellular loop II of the kappa opioid receptor in a DPC micelle. *Biochemistry* 41, 61-68.
- (44) Ruan, K. H., So, S. P., Wu, J., Li, D., Huang, A., and Kung, J. (2001) Solution structure of the second extracellular loop of human thromboxane A2 receptor. *Biochemistry* 40, 275-280.
- (45) Giragossian, C., and Mierke, D. F. (2001) Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin A receptor. *Biochemistry* 40, 3804-3809.

- (46) Piserchio, A., Bisello, A., Rosenblatt, M., Chorev, M., and Mierke, D. F. (2000) Characterization of parathyroid hormone/receptor interactions: structure of the first extracellular loop. *Biochemistry* 39, 8153-8160.
- (47) Dyson, H. J., Merutka, G., Waltho, J. P., Lerner, R. A., and Wright, P. E. (1992) Folding of peptide fragments comprising the complete sequence of proteins. Models for initiation of protein folding. I. Myohemerythrin. *J. Mol. Biol.* 226, 795-817.
- (48) Sheriff, S., Hendrickson, W. A., and Smith, J. L. (1987) Structure of myohemerythrin in the azidomet state at 1.7/1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 197, 273-296.
- (49) Yeagle, P. L., Danis, C., Choi, G., Alderfer, J. L., and Albert, A. D. (2000) Three dimensional structure of the seventh transmembrane helical domain of the G-protein receptor, rhodopsin. *Mol. Vis.* 6, 125-131.
- (50) Bern, H. A., and Lederis, K. (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J. Endocrinol.* 45, Suppl:xi-xii.
- (51) Pearson, D., Shively, J. E., Clark, B. R., Geschwind, II, Barkley, M., Nishioka, R. S., and Bern, H. A. (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5021-5024.
- (52) Ohsako, S., Ishida, I., Ichikawa, T., and Deguchi, T. (1986) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of urotensin II-alpha and -gamma. *J. Neurosci.* 6, 2730-2735.
- (53) Conlon, J. M., O'Harte, F., Smith, D. D., Tonon, M. C., and Vaudry, H. (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 578-583.
- (54) Coulouarn, Y., Lihrmann, I., Jegou, S., Anouar, Y., Tostivint, H., Beauvillain, J. C., Conlon, J. M., Bern, H. A., and Vaudry, H. (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15803-15808.
- (55) Coulouarn, Y., Jegou, S., Tostivint, H., Vaudry, H., and Lihrmann, I. (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett.* 457, 28-32.
- (56) Mori, M., Sugo, T., Abe, M., Shimomura, Y., Kurihara, M., Kitada, C., Kikuchi, K., Shintani, Y., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 265, 123-129.
- (57) Vale, W., Brazeau, P., Grant, G., Nussey, A., Burgus, R., Rivier, J., Ling, N., and Guillemin, R. (1972) [Preliminary observations on the mechanism of action of somatostatin, a hypothalamic factor inhibiting the secretion of growth hormone]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 275, 2913-2916.
- (58) Veber, D. F., Holly, F. W., Paleveda, W. J., Nutt, R. F., Bergstrand, S. J., Torchiana, M., Glitzer, M. S., Saperstein, R., and Hirschmann, R. (1978) Conformationally restricted bicyclic analogs of somatostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2636-2640.

- (59) Panteris, V., and Karamanolis, D. G. (2005) The puzzle of somatostatin: action, receptors, analogues and therapy. *Hepatogastroenterology* 52, 1771-1781.
- (60) Stoller, T. J., and Shields, D. (1989) The role of paired basic amino acids in mediating proteolytic cleavage of prosomatostatin. Analysis using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 264, 6922-6928.
- (61) Ames, R. S., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Willette, R. N., Aiyar, N. V., Romanic, A. M., Loudon, C. S., Foley, J. J., Sauermelch, C. F., Coatney, R. W., Ao, Z., Disa, J., Holmes, S. D., Stadel, J. M., Martin, J. D., Liu, W. S., Glover, G. I., Wilson, S., McNulty, D. E., Ellis, C. E., Elshourbagy, N. A., Shabon, U., Trill, J. J., Hay, D. W., Ohlstein, E. H., Bergsma, D. J., and Douglas, S. A. (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 401, 282-286.
- (62) Nothacker, H. P., Wang, Z., McNeill, A. M., Saito, Y., Merten, S., O'Dowd, B., Duckles, S. P., and Civelli, O. (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat. Cell. Biol.* 1, 383-385.
- (63) Liu, Q., Pong, S. S., Zeng, Z., Zhang, Q., Howard, A. D., Williams, D. L., Jr., Davidoff, M., Wang, R., Austin, C. P., McDonald, T. P., Bai, C., George, S. R., Evans, J. F., and Caskey, C. T. (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 174-178.
- (64) Douglas, S. A., and Ohlstein, E. H. (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 229-237.
- (65) MacLean, M. R., Alexander, D., Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Morecroft, I., and Pollard, K. (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 130, 201-204.
- (66) Douglas, S. A., Ashton, D. J., Sauermelch, C. F., Coatney, R. W., Ohlstein, D. H., Ruffolo, M. R., Ohlstein, E. H., Aiyar, N. V., and Willette, R. N. (2000) Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36, S163-166.
- (67) Douglas, S. A., Sulpizio, A. C., Piercy, V., Sarau, H. M., Ames, R. S., Aiyar, N. V., Ohlstein, E. H., and Willette, R. N. (2000) Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1262-1274.
- (68) Maguire, J. J., and Davenport, A. P. (2002) Is urotensin-II the new endothelin? *Br. J. Pharmacol.* 137, 579-588.
- (69) Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* 131, 441-446.
- (70) Camarda, V., Rizzi, A., Calo, G., Gendron, G., Perron, S. I., Kostenis, E., Zamboni, P., Mascoli, F., and Regoli, D. (2002) Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365, 141-149.

- (71) Gardiner, S. M., March, J. E., Kemp, P. A., Davenport, A. P., and Bennett, T. (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1625-1629.
- (72) Gibson, A. (1987) Complex effects of *Gillichthys* urotensin II on rat aortic strips. *Br. J. Pharmacol.* 91, 205-212.
- (73) Conlon, J. M., Yano, K., Waugh, D., and Hazon, N. (1996) Distribution and molecular forms of urotensin II and its role in cardiovascular regulation in vertebrates. *J. Exp. Zool.* 275, 226-238.
- (74) Leslie, S. J., Affolter, J., Denvir, M. A., and Webb, D. J. (2003) Validation of laser Doppler flowmetry coupled with intra-dermal injection for investigating effects of vasoactive agents on the skin microcirculation in man. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 99-102.
- (75) Bohm, F., and Pernow, J. (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *Br J Pharmacol* 135, 25-27.
- (76) Wilkinson, I. B., Affolter, J. T., de Haas, S. L., Pellegrini, M. P., Boyd, J., Winter, M. J., Balment, R. J., and Webb, D. J. (2002) High plasma concentrations of human urotensin II do not alter local or systemic hemodynamics in man. *Cardiovasc Res* 53, 341-347.
- (77) Tzanidis, A., Hannan, R. D., Thomas, W. G., Onan, D., Autelitano, D. J., See, F., Kelly, D. J., Gilbert, R. E., and Krum, H. (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Res.* 93, 246-253.
- (78) Winter, M. J., Hubbard, P. C., McCrohan, C. R., and Balment, R. J. (1999) A homologous radioimmunoassay for the measurement of urotensin II in the euryhaline flounder, *Platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol* 114, 249-256.
- (79) Gartlon, J., Parker, F., Harrison, D. C., Douglas, S. A., Ashmeade, T. E., Riley, G. J., Hughes, Z. A., Taylor, S. G., Munton, R. P., Hagan, J. J., Hunter, J. A., and Jones, D. N. (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155, 426-433.
- (80) Kelsall, C. J., and Balment, R. J. (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. *Gen Comp Endocrinol* 112, 210-219.
- (81) Conlon, J. M. (2000) Singular contributions of fish neuroendocrinology to mammalian regulatory peptide research. *Regul. Pept.* 93, 3-12.
- (82) Lancien, F., Leprince, J., Mimassi, N., Mabin, D., Vaudry, H., and Le Mevel, J. C. (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* 1023, 167-174.
- (83) Sugo, T., Murakami, Y., Shimomura, Y., Harada, M., Abe, M., Ishibashi, Y., Kitada, C., Miyajima, N., Suzuki, N., Mori, M., and Fujino, M. (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 860-868.
- (84) Sugo, T., and Mori, M. (2007) Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14 Discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides*.
- (85) Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H. H., Saldivia, V. R., Cheng, R., Murphy, P. M., Tsui, L. C., Shi, X., Gregor, P., and et al. (1995) Cloning and

- chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 29, 335-344.
- (86) Tal, M., Ammar, D. A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., Naim, M., and Thompson, D. A. (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 752-759.
 - (87) Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., Spedding, M., and Harmar, A. J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 57, 279-288.
 - (88) Lu, M., Blacklow, S. C., and Kim, P. S. (1995) A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1075-1082.
 - (89) Boucard, A. A., Sauve, S. S., Guillemette, G., Escher, E., and Leduc, R. (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *Biochem. J.* 370, 829-838.
 - (90) Holleran, B. J., Beaulieu, M. E., Proulx, C. D., Lavigne, P., Escher, E., and Leduc, R. (2007) Photolabelling the urotensin II receptor reveals distinct agonist- and partial-agonist-binding sites. *Biochem J* 402, 51-61.
 - (91) Itoh, H., Itoh, Y., Rivier, J., and Lederis, K. (1987) Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol* 252, R361-366.
 - (92) Brkovic, A., Hattenberger, A., Kostenis, E., Klabunde, T., Flohr, S., Kurz, M., Bourgault, S., and Fournier, A. (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 1200-1209.
 - (93) Chatenet, D., Dubessy, C., Leprince, J., Boullaran, C., Carlier, L., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Oulyadi, H., Davoust, D., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Tonon, M. C., Lihmann, I., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* 25, 1819-1830.
 - (94) Hocart, S. J., Jain, R., Murphy, W. A., Taylor, J. E., and Coy, D. H. (1999) Highly potent cyclic disulfide antagonists of somatostatin. *J. Med. Chem.* 42, 1863-1871.
 - (95) Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Sasi, R., Patel, R. C., and Patel, Y. C. (2000) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 275, 7862-7869.
 - (96) Hocart, S. J., Jain, R., Murphy, W. A., Taylor, J. E., Morgan, B., and Coy, D. H. (1998) Potent antagonists of somatostatin: synthesis and biology. *J. Med. Chem.* 41, 1146-1154.
 - (97) Rajeswaran, W. G., Hocart, S. J., Murphy, W. A., Taylor, J. E., and Coy, D. H. (2001) Highly potent and subtype selective ligands derived by N-methyl scan of a somatostatin antagonist. *J Med Chem* 44, 1305-1311.
 - (98) Grace, C. R., Perrin, M. H., DiGruccio, M. R., Miller, C. L., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2004) NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12836-12841.
 - (99) Flohr, S., Kurz, M., Kostenis, E., Brkovich, A., Fournier, A., and Klabunde, T. (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity

- relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J. Med. Chem.* 45, 1799-1805.
- (100) Carotenuto, A., Grieco, P., Novellino, E., and Rovero, P. (2004) Urotensin-II receptor peptide agonists. *Med. Res. Rev.* 24, 577-588.
 - (101) Kinney, W. A., Almond Jr, H. R., Qi, J., Smith, C. E., Santulli, R. J., de Garavilla, L., Andrade-Gordon, P., Cho, D. S., Everson, A. M., Feinstein, M. A., Leung, P. A., and Maryanoff, B. E. (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 2940-2944.
 - (102) Labarrere, P., Chatenet, D., Leprince, J., Marionneau, C., Loirand, G., Tonon, M. C., Dubessy, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Calas, B., Pacaud, P., and Vaudry, H. (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18, 77-88.
 - (103) Chatenet, D., Dubessy, C., Boularan, C., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Lihrmann, I., Pacaud, P., Tonon, M. C., Vaudry, H., and Leprince, J. (2006) Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: identification of a urotensin II antagonist. *J. Med. Chem.* 49, 7234-7238.
 - (104) Fong, T. M., Huang, R. R., and Strader, C. D. (1992) Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 25664-25667.
 - (105) Lee, J. A., Brinkmann, J. A., Longton, E. D., Peishoff, C. E., Lago, M. A., Leber, J. D., Cousins, R. D., Gao, A., Stadel, J. M., Kumar, C. S., and et al. (1994) Lysine 182 of endothelin B receptor modulates agonist selectivity and antagonist affinity: evidence for the overlap of peptide and non-peptide ligand binding sites. *Biochemistry* 33, 14543-14549.
 - (106) Mauzy, C., Wu, L. H., Egloff, A. M., Mirzadegan, T., and Chung, F. Z. (1992) Substitution of lysine-181 to aspartic acid in the third transmembrane region of the endothelin (ET) type B receptor selectively reduces its high-affinity binding with ET-3 peptide. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S5-7.
 - (107) Zhu, G., Wu, L. H., Mauzy, C., Egloff, A. M., Mirzadegan, T., and Chung, F. Z. (1992) Replacement of lysine-181 by aspartic acid in the third transmembrane region of endothelin type B receptor reduces its affinity to endothelin peptides and sarafotoxin 6c without affecting G protein coupling. *J. Cell. Biochem.* 50, 159-164.
 - (108) Kaupmann, K., Bruns, C., Raulf, F., Weber, H. P., Mattes, H., and Lubbert, H. (1995) Two amino acids, located in transmembrane domains VI and VII, determine the selectivity of the peptide agonist SMS 201-995 for the SSTR2 somatostatin receptor. *Embo J* 14, 727-735.
 - (109) Grieco, P., Rovero, P., and Novellino, E. (2004) Recent structure-activity studies of the peptide hormone urotensin-II, a potent vasoconstrictor. *Curr. Med. Chem.* 11, 969-979.
 - (110) Bhaskaran, R., Arunkumar, A. I., and Yu, C. (1994) NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1199, 115-122.

- (111) Grieco, P., Carotenuto, A., Campiglia, P., Zampelli, E., Patacchini, R., Maggi, C. A., Novellino, E., and Rovero, P. (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *J. Med. Chem.* **45**, 4391-4394.
- (112) Carotenuto, A., Grieco, P., Campiglia, P., Novellino, E., and Rovero, P. (2004) Unraveling the active conformation of urotensin II. *J. Med. Chem.* **47**, 1652-1661.
- (113) Melacini, G., Zhu, Q., and Goodman, M. (1997) Multiconformational NMR analysis of sandostatin (octreotide): equilibrium between beta-sheet and partially helical structures. *Biochemistry* **36**, 1233-1241.
- (114) Pohl, E., Heine, A., Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., Kallen, J., Huber, W., and Pfaffli, P. J. (1995) Structure of octreotide, a somatostatin analogue. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **51**, 48-59.
- (115) Falb, E., Salitra, Y., Yechezkel, T., Bracha, M., Litman, P., Olender, R., Rosenfeld, R., Senderowitz, H., Jiang, S., and Goodman, M. (2001) A bicyclic and hsst2 selective somatostatin analogue: design, synthesis, conformational analysis and binding. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 3255-3264.
- (116) Freidinger, R. M., Perlow, D. S., Randall, W. C., Saperstein, R., Arison, B. H., and Veber, D. F. (1984) Conformational modifications of cyclic hexapeptide somatostatin analogs. *Int J Pept Protein Res* **23**, 142-150.
- (117) Podlogar, B. L., Poda, G. I., Demeter, D. A., Zhang, S. P., Carson, J. R., Neilson, L. A., Reitz, A. B., and Ferguson, D. M. (2000) Synthesis and evaluation of 4-(N,N-diarylamino)piperidines with high selectivity to the delta-opioid receptor: a combined 3D-QSAR and ligand docking study. *Drug. Des. Discov.* **17**, 34-50.
- (118) Petry, R., Craik, D., Haaima, G., Fromme, B., Klump, H., Kiefer, W., Palm, D., and Millar, R. (2002) Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Med. Chem.* **45**, 1026-1034.
- (119) Strader, C. D., Sigal, I. S., and Dixon, R. A. (1989) Genetic approaches to the determination of structure-function relationships of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* **26**, 26-30.
- (120) Lavecchia, A., Cosconati, S., and Novellino, E. (2005) Architecture of the human urotensin II receptor: comparison of the binding domains of peptide and non-peptide urotensin II agonists. *J. Med. Chem.* **48**, 2480-2492.
- (121) Thuau, R., Guilhaudis, L., Segalas-Milazzo, I., Chartrel, N., Oulyadi, H., Boivin, S., Fournier, A., Leprince, J., Davoust, D., and Vaudry, H. (2005) Structural studies on 26RFa, a novel human RFamide-related peptide with orexigenic activity. *Peptides* **26**, 779-789.
- (122) Zou, Y., Nagai, R., and Yamazaki, T. (2001) Urotensin II induces hypertrophic responses in cultured cardiomyocytes from neonatal rats. *FEBS Lett.* **508**, 57-60.
- (123) Zhu, Y. C., Zhu, Y. Z., and Moore, P. K. (2006) The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 884-901.
- (124) Krum, H., and Kemp, W. (2007) Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension. *Curr Hypertens Rep* **9**, 53-58.
- (125) Bousette, N., and Giaid, A. (2006) Urotensin-II and cardiovascular diseases. *Curr Hypertens Rep* **8**, 479-483.

- (126) Ashton, N. (2006) Renal and vascular actions of urotensin II. *Kidney Int.* 70, 624-629.
- (127) Nagayama, Y., Wadsworth, H. L., Chazenbalk, G. D., Russo, D., Seto, P., and Rapoport, B. (1991) Thyrotropin-luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 902-905.
- (128) Wang, J. B., Johnson, P. S., Wu, J. M., Wang, W. F., and Uhl, G. R. (1994) Human kappa opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human mu/kappa chimeras. *J Biol Chem* 269, 25966-25969.
- (129) Langer, I., Vertongen, P., Perret, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (2003) Lysine 195 and aspartate 196 in the first extracellular loop of the VPAC1 receptor are essential for high affinity binding of agonists but not of antagonists. *Neuropharmacology* 44, 125-131.
- (130) So, S. P., Wu, J., Huang, G., Huang, A., Li, D., and Ruan, K. H. (2003) Identification of residues important for ligand binding of thromboxane A2 receptor in the second extracellular loop using the NMR experiment-guided mutagenesis approach. *J. Biol. Chem.* 278, 10922-10927.
- (131) Adachi, M., Hashido, K., Trzeciak, A., Watanabe, T., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1993) Functional domains of human endothelin receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 Suppl 8, S121-124.
- (132) Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sawamura, T., Enoki, T., Ohtani, T., Sakurai, T., Nakao, K., Toyooka, T., and Masaki, T. (1993) Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J. Biol. Chem.* 268, 8547-8553.
- (133) Tusnady, G. E., and Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- (134) Tusnady, G. E., and Simon, I. (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* 283, 489-506.
- (135) Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378-379.
- (136) Chen, Y., Yu, P., Luo, J., and Jiang, Y. (2003) Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT. *Mamm Genome* 14, 859-865.
- (137) Claros, M. G., and von Heijne, G. (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci* 10, 685-686.
- (138) Small, D. M. (1998) Potpourri: effects of unsaturation on lipid structure; plasma cholesterol ester and lipid-transfer proteins; and cholesterol-sensing proteins and cellular cholesterol movement. *Curr Opin Struct Biol* 8, 413-416.
- (139) Besenica, M., Macek, P., Lakey, J. H., and Anderluh, G. (2006) Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chem Phys Lipids* 141, 169-178.
- (140) Ott, T. R., Troskie, B. E., Roeske, R. W., Illing, N., Flanagan, C. A., and Millar, R. P. (2002) Two mutations in extracellular loop 2 of the human GnRH receptor convert an antagonist to an agonist. *Mol Endocrinol* 16, 1079-1088.

- (141) Sakmar, T. P., Menon, S. T., Marin, E. P., and Awad, E. S. (2002) Rhodopsin: insights from recent structural studies. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 443-484.
- (142) Turek, J. W., Halmos, T., Sullivan, N. L., Antonakis, K., and Le Breton, G. C. (2002) Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A2 receptor protein. *J Biol Chem* 277, 16791-16797.
- (143) Lequin, O., Bolbach, G., Frank, F., Convert, O., Girault-Lagrange, S., Chassaing, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2002) Involvement of the second extracellular loop (E2) of the neurokinin-1 receptor in the binding of substance P. Photoaffinity labeling and modeling studies. *J Biol Chem* 277, 22386-22394.
- (144) Zoffmann, S., Chollet, A., and Galzi, J. L. (2002) Identification of the extracellular loop 2 as the point of interaction between the N terminus of the chemokine MIP-1alpha and its CCR1 receptor. *Mol Pharmacol* 62, 729-736.
- (145) Matsuura, B., Dong, M., and Miller, L. J. (2002) Differential determinants for peptide and non-peptidyl ligand binding to the motilin receptor. Critical role of second extracellular loop for peptide binding and action. *J Biol Chem* 277, 9834-9839.
- (146) Vertongen, P., Solano, R. M., Juarranz, M. G., Perret, J., Waelbroeck, M., and Robberecht, P. (2001) Proline residue 280 in the second extracellular loop (EC2) of the VPAC2 receptor is essential for the receptor structure. *Peptides* 22, 1363-1370.
- (147) Zhao, M. M., Hwa, J., and Perez, D. M. (1996) Identification of critical extracellular loop residues involved in alpha 1-adrenergic receptor subtype-selective antagonist binding. *Mol Pharmacol* 50, 1118-1126.
- (148) Lequin, O., Bolbach, G., Frank, F., Convert, O., Girault-Lagrange, S., Chassaing, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2002) Involvement of the second extracellular loop (E2) of the neurokinin-1 receptor in the binding of substance P. Photoaffinity labeling and modeling studies. *J. Biol. Chem.* 277, 22386-22394.
- (149) Ma, D., Liu, Z., Li, L., Tang, P., and Xu, Y. (2005) Structure and dynamics of the second and third transmembrane domains of human glycine receptor. *Biochemistry* 44, 8790-8800.
- (150) Ruan, K. H., Wu, J., So, S. P., and Jenkins, L. A. (2003) Evidence of the residues involved in ligand recognition in the second extracellular loop of the prostacyclin receptor characterized by high resolution 2D NMR techniques. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 25-33.
- (151) Yeagle, P. L., Alderfer, J. L., and Albert, A. D. (1995) Structure of the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. *Biochemistry* 34, 14621-14625.
- (152) Akal-Strader, A., Khare, S., Xu, D., Naider, F., and Becker, J. M. (2002) Residues in the first extracellular loop of a G protein-coupled receptor play a role in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277, 30581-30590.
- (153) Trumpp-Kallmeyer, S., Chini, B., Mouillac, B., Barberis, C., Hoflack, J., and Hibert, M. (1995) Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm. Acta. Helv.* 70, 255-262.

- (154) Knudsen, S. M., Tams, J. W., Wulff, B. S., and Fahrenkrug, J. (1997) A disulfide bond between conserved cysteines in the extracellular loops of the human VIP receptor is required for binding and activation. *FEBS Lett.* 412, 141-143.
- (155) Mirzadegan, T., Benko, G., Filipek, S., and Palczewski, K. (2003) Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 42, 2759-2767.
- (156) Abdulaev, N. G., Ngo, T., Chen, R., Lu, Z., and Ridge, K. D. (2000) Functionally discrete mimics of light-activated rhodopsin identified through expression of soluble cytoplasmic domains. *J Biol Chem* 275, 39354-39363.
- (157) Harding, P. J., Hadingham, T. C., McDonnell, J. M., and Watts, A. (2006) Direct analysis of a GPCR-agonist interaction by surface plasmon resonance. *Eur Biophys J* 35, 709-712.
- (158) Nicastro, G., Peri, F., Franzoni, L., de Chiara, C., Sartor, G., and Spisni, A. (2003) Conformational features of a synthetic model of the first extracellular loop of the angiotensin II AT1A receptor. *J. Pept. Sci.* 9, 229-243.
- (159) Naider, F., Khare, S., Arshava, B., Severino, B., Russo, J., and Becker, J. M. (2005) Synthetic peptides as probes for conformational preferences of domains of membrane receptors. *Biopolymers* 80, 199-213.
- (160) Buck, M. (1998) Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q Rev Biophys* 31, 297-355.
- (161) Mattice, W. L., Riser, J. M., and Clark, D. S. (1976) Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 15, 4264-4272.
- (162) Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- (163) Archer, E., Maigret, B., Escrieut, C., Pradayrol, L., and Fourmy, D. (2003) Rhodopsin crystal: new template yielding realistic models of G-protein-coupled receptors? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 36-40.
- (164) Hamada, D., Kuroda, Y., Tanaka, T., and Goto, Y. (1995) High helical propensity of the peptide fragments derived from beta-lactoglobulin, a predominantly beta-sheet protein. *J Mol Biol* 254, 737-746.
- (165) Callihan, D. E., and Logan, T. M. (1999) Conformations of peptide fragments from the FK506 binding protein: comparison with the native and urea-unfolded states. *J Mol Biol* 285, 2161-2175.
- (166) Ulfers, A. L., Piserchio, A., and Mierke, D. F. (2002) Extracellular domains of the neurokinin-1 receptor: structural characterization and interactions with substance P. *Biopolymers* 66, 339-349.
- (167) Chou, K. C. (2000) Prediction of tight turns and their types in proteins. *Anal Biochem* 286, 1-16.
- (168) Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids. *New York: Wiley.*
- (169) Chung, D. A., Zuiderweg, E. R., Fowler, C. B., Soyer, O. S., Mosberg, H. I., and Neubig, R. R. (2002) NMR structure of the second intracellular loop of the alpha 2A adrenergic receptor: evidence for a novel cytoplasmic helix. *Biochemistry* 41, 3596-3604.

- (170) Popot, J. L., and Engelman, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69, 881-922.
- (171) Zhang, L., Wu, J., and Ruan, K. H. (2006) Solution structure of the first intracellular loop of prostacyclin receptor and implication of its interaction with the C-terminal segment of G alpha s protein. *Biochemistry* 45, 1734-1744.
- (172) Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223.
- (173) Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 409-435.
- (174) George, S. R., O'Dowd, B. F., and Lee, S. P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 808-820.
- (175) Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30-34.
- (176) Stirrat, A., Gallagher, M., Douglas, S. A., Ohlstein, E. H., Berry, C., Kirk, A., Richardson, M., and MacLean, M. R. (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 280, H925-928.