

► Parmi les différentes classes de protéines membranaires, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent une famille majeure. Ils sont impliqués dans la plupart des grandes fonctions physiologiques et jouent un rôle primordial dans la communication intercellulaire et la réception des signaux sensoriels. Ils constituent la cible de 30 % des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique. Pour comprendre le fonctionnement de ces récepteurs, aborder leur structure tridimensionnelle et développer des médicaments sélectifs et efficaces, il est nécessaire de purifier ces protéines afin de bien les caractériser. Cependant, cette étape n'est pas triviale, car les RCPG sont présents en très petite quantité dans la membrane plasmique, et leur environnement lipidique naturel suppose une extraction et une manipulation à l'aide de détergents. Il n'existe pas d'approche universelle aujourd'hui qui permette la production, la purification et la stabilisation des RCPG. Chacun de ces récepteurs possède des caractéristiques physicochimiques uniques, une préférence particulière pour certains détergents lors de leur solubilisation et des conditions spécifiques pour leur purification. Ces dernières années, de grandes avancées en termes de surexpression, de purification et surtout de stabilisation des RCPG, en particulier grâce aux amphipols et aux nanodisques, ont ouvert des perspectives très encourageantes pour l'étude structurale et l'analyse dynamique de ces protéines membranaires. Ces différents aspects de la manipulation des RCPG sont développés dans cette revue. ◀

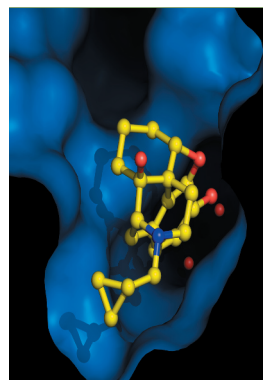
Stratégies de surexpression des RCPG : des protéines membranaires minoritaires

La faible abondance des RCPG dans les tissus de notre organisme, si l'on excepte la rhodopsine de la rétine, empêche toute purification en quantité compatible

Manipulation des récepteurs couplés aux protéines G

Expression, purification et stabilisation *in vitro*

Jean-Louis Banères¹, Bernard Mouillac²



avec des analyses biochimiques et structurales. Leur surexpression est donc une condition préalable obligatoire si l'on veut aborder leur structure moléculaire, leur dynamique au cours de la liaison de ligands (drogues, médicaments) ou l'étude de leurs interactions avec des partenaires de signalisation tels que les protéines G ou les arrestines.

Le développement de systèmes d'expression hétérologues capables de produire des protéines recombinantes fonctionnelles avec des rendements élevés constitue donc une étape essentielle. Une large palette de systèmes cellulaires adaptés à la production des RCPG est aujourd'hui disponible (voir quelques exemples représentatifs dans le *Tableau I*).

Expression et production bactérienne chez *E. coli*

La bactérie *Escherichia coli* est le système de production de protéines membranaires le plus commun. Il est simple, peu coûteux, le temps de génération du bacille est court, il peut être manipulé sans danger, et les volumes de culture peuvent être aisément augmentés. De plus, les rendements d'expression sont élevés et la protéine recombinante est structuralement homogène (pas de modifications post-traductionnelles chez *E. coli*). Les RCPG sont ciblés soit à la membrane interne, soit en corps d'inclusion cytoplasmiques, dans les deux cas sous forme de protéines de fusion par un couplage à un partenaire ou un épitope court. Les corps d'inclusion représentent une alternative intéressante, mais la protéine recombinante doit être manipulée en conditions dénaturantes, puis être ensuite repliée sous forme native et fonctionnelle. La production du récepteur NTS1 de la neurotensine est sans conteste le plus bel exemple de succès

¹ CNRS, UMR 5247, institut des biomolécules Max Mousseron, faculté de pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, 34000 Montpellier, France ; universités de Montpellier 1 et 2, 34000 Montpellier, France ; jean-louis.baneres@univ-montp1.fr

² CNRS UMR 5203, institut de génomique fonctionnelle, 141, rue de La Cardonille, 34000 Montpellier, France ; Inserm U661, 34000 Montpellier, France ; universités de Montpellier 1 et 2, 34000 Montpellier, France. bernard.mouillac@igf.cnrs.fr

RCPG/ligand	Système cellulaire	Stratégie de surexpression	Purification	Réf.
NTS1/ neurotensine	Procaryote Bactérie <i>Escherichia coli</i>	Membranaire Fusion MBP–Trx, épitope 6×His	1) IMAC 2) Chromatographie d'affinité (ligand fixé = neurotensine)	[1]
BLT2/ leucotriène B4	Procaryote Bactérie <i>Escherichia coli</i>	Corps d'inclusion Fusion intégrine, épitope 6×His	1) IMAC 2) Chromatographie d'affinité (ligand fixé = antagoniste 5bα)	[2]
μ-opioïde/ enképhalines	Eucaryote unicellulaire Levure <i>Pichia pastoris</i>	Membranaire Fusion GFP (optionnel), épitope 6×His	IMAC	[5]
H1/ histamine	Eucaryote unicellulaire Levure <i>Pichia pastoris</i>	Membranaire Fusion T4L et GFP, épitope 6×His	IMAC	[6]
β2AR/ adrénaline noradrénaline	Eucaryote Insecte <i>Spodoptera frugiperda</i> (cellules Sf9)	Membranaire, épitope <i>Flag</i> (T4L optionnel)	1) Anticorps 2) Chromatographie d'affinité (ligand fixé = antagoniste alprénolol)	[7]
CXCR4/ chémokines	Eucaryote Insecte <i>Spodoptera frugiperda</i> (cellules Sf9)	Membranaire Fusion T4L, épitope 6×His	IMAC	[10]
Rhodopsine/ rétinal	Eucaryote Mammifère, singe vert africain (cellules COS-1)	Membranaire, épitope 1D4	1) Anticorps 2) IEX	[12]
M1/ acétylcholine	Eucaryote Mammifère, hamster (cellules BHK-21)	Membranaire, épitopes <i>Flag</i> et biotine	Pas décrite	[13]
A1/ adénosine	Eucaryote Mammifère, souris (rétine)	Membranaire, épitope 1D4	Anticorps	[16]
ETA, ETB/ endothéline	Acellulaire, <i>in vitro</i> Extraits bactériens ou extraits de réticulocytes	Micelles détergents ou précipité, épitope T7, épitope 6×His	IMAC	[17]

Tableau I. Exemples représentatifs de stratégies de surexpression des RCPG, de systèmes cellulaires et d'approches de purification. IMAC : *immobilized metal affinity chromatography* ; MBP : *maltose-binding protein* ; Trx : thiorédoxine ; 6×His : peptide de 6 résidus histidine ; GFP : *green fluorescent protein* ; T4L : T4 lysozyme ; IEX : *ion exchange chromatography* ; épitope *flag* : peptide ADDDDKYD ; épitope 1D4 : peptide TETSQVAPA ; épitope T7 : peptide MASMTGGQQMG.



d'expression et de purification d'un RCPG à grande échelle par l'approche d'insertion membranaire [1]. Les données accumulées pour les récepteurs BLT1 et BLT2 du leucotriène LTB₄ sont nombreuses et montrent que l'accumulation en corps d'inclusion bactériens est également particulièrement prometteuse [2]. Aujourd'hui, l'approche « bactérie » a conduit à la détermination par résonance magnétique nucléaire (RMN) de la structure tridimensionnelle (3D) de ligands liés à deux récepteurs purifiés, celle de la neurotensine et celle du leucotriène LTB₄ [3, 4].

Expression et production chez la levure

La levure, eucaryote unicellulaire, combine plusieurs avantages. Elle réalise la plupart des modifications post-traductionnelles effectuées chez les eucaryotes supérieurs, ses conditions de culture en suspension sont équivalentes à celles des bactéries et elle peut, comme *E. coli*, être manipulée aisément d'un point de vue génétique. La glycosylation des protéines chez les levures (plutôt hyperglycosylation), ainsi que la composition de la membrane plasmique (pas de cholestérol) de cet organisme, diffèrent de celles des cellules de mammifères. Cela peut avoir des conséquences cruciales sur le repliement, la stabilité ou l'activité des RCPG recombinants. Deux souches sont généralement utilisées, *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, la deuxième présentant l'avantage de pouvoir être cultivée à très haute densité. L'expression et la purification du RCPG μ -opioïde ont été particulièrement optimisées chez *P. pastoris* [5]. La structure 3D du complexe récepteur H1 de l'histamine avec la doxépine (antagoniste) vient d'être publiée, suite à l'expression de ce RCPG chez *P. pastoris* [6].

Expression et production dans les cellules d'insecte

L'infection de cellules d'insecte par un baculovirus recombinant constitue aujourd'hui une des méthodes de surexpression des RCPG les plus valorisées. Même si les milieux de culture sont beaucoup plus coûteux que ceux utilisés pour les bactéries ou les levures, ce système reste mieux adapté à une culture à grande échelle que les cellules de mammifère. La glycosylation des protéines recombinantes y reste limitée à l'addition de mannose, et la membrane plasmique des cellules présente un taux de cholestérol faible. Cependant, les rendements de production des RCPG sont élevés. La fonctionnalité des RCPG, mesurée par des tests de liaison de radioligands ou par le couplage à des protéines G purifiées, est identique à celle des récepteurs exprimés dans leur environnement cellulaire original. Le système Bac to Bac™, fondé sur l'utilisation d'un plasmide bactérien recombinant dans lequel le gène codant pour le RCPG est inséré au sein de séquences de recombinaison avec le génome du virus, est actuellement le plus populaire. Les cellules les plus utilisées sont celles de lépidoptères, comme les Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). La grande majorité des structures 3D des RCPG complexés à des antagonistes ou à des agonistes publiées récemment, par exemple celles des récepteurs β 1 et β 2 adrénergiques (β 1AR et β 2AR), D3 de la dopamine, CXCR4 des chimiokines, et A_{2A} de l'adénosine, ont été déterminées après production des récepteurs en cellules Sf9 [7-11].

Systèmes d'expression homologue de mammifère

Les cellules de mammifère représentent théoriquement le système idéal de surexpression des RCPG puisqu'elles constituent l'environnement naturel des récepteurs (même si les RCPG sont aussi des protéines endogènes chez d'autres organismes non-mammifères). Cependant, l'obtention de récepteurs purs en quantités compatibles avec les approches de biologie structurale s'avère très onéreuse (milieu de culture coûteux, mise en place d'incubateurs à atmosphère contrôlée, difficulté d'optimiser les cultures à grande échelle). De plus, les modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, peuvent mener à l'obtention de préparations protéiques très hétérogènes, ce qui est un désavantage pour des perspectives de cristallogénèse. L'expression des RCPG en cellules mammifères est réalisée par transfection transitoire, par sélection de clones recombinants stables ou par infection à l'aide de vecteurs viraux. La première structure atomique d'un RCPG recombinant est celle d'un mutant thermostable de la rhodopsine surexprimé de façon transitoire dans les cellules COS-1 [12]. Plus d'une centaine de RCPG recombinants ont été surexprimés dans des cellules BHK-21 (*baby hamster kidney cell-21*) infectées par le virus SVF (*Semliki Forest virus*) [13]. Cette méthode est attractive, car le virus peut infecter un grand nombre de lignées cellulaires et de cultures primaires, et il s'adapte aux cultures adhérentes ou en suspension (bioréacteurs).

La rétine des yeux de souris transgéniques (ou même de drosophile et de xénope) constitue une nouvelle alternative à la surexpression des RCPG. Cette stratégie est basée sur l'observation que la rhodopsine, seul RCPG dont la structure 3D a été déterminée grâce à sa purification à partir de membranes natives, est compactée naturellement à très haute densité dans les membranes spécialisées des cellules photoréceptrices. L'idée de remplacer dans ces membranes la rhodopsine par d'autres RCPG sous le contrôle de promoteurs spécifiques est donc très attractive. Elle a porté ses fruits vis-à-vis de plusieurs récepteurs cibles, comme le récepteur métabotrope du glutamate de drosophile [14], le récepteur 5HT_{1A} humain de la sérotonine [15] et le récepteur A₁ murin de l'adénosine [16].

Systèmes d'expression acellulaire *in vitro*

Enfin, les RCPG peuvent être produits *in vitro* dans des systèmes acellulaires qui miment l'environnement naturel du cytoplasme des cellules. Ces systèmes acellulaires contiennent en général des extraits de bactéries, de germe de blé ou de réticulocytes de lapin pour assurer une synthèse protéique continue. On peut direc-

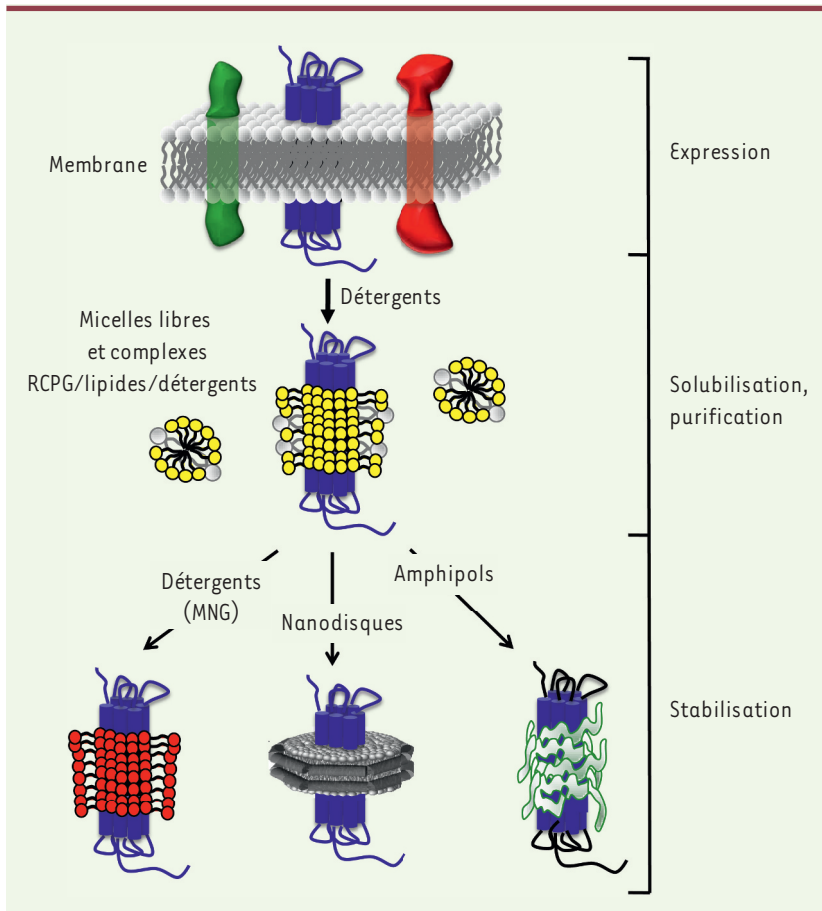


Figure 1. Les étapes de manipulation des RCPG. Les RCPG (schématisés en bleu) sont des protéines membranaires intégrales et, dans la majorité des cas, sont surexprimés à la membrane plasmique des cellules hôtes (le cas des RCPG produits en corps d'inclusion bactériens ou en systèmes acellulaires n'est pas pris en compte ici). Ils sont extraits de leur environnement membranaire à l'aide de détergents (ici en jaune) au cours d'une étape de solubilisation. À ce stade, les RCPG sont complexés aux lipides (en gris) et aux détergents. Ils sont ensuite purifiés par différentes approches de chromatographie, par exemple par immunoaffinité (anticorps dirigé contre un épitope naturel ou inséré dans la séquence primaire du RCPG) ou *via* une stratégie IMAC. Au cours des étapes de purification, si les détergents utilisés lors de l'extraction dénaturent le RCPG, un échange de détergents peut s'avérer nécessaire. Enfin, sous forme purifiée, les RCPG sont stabilisés par des surfactants qui maintiennent leurs propriétés fonctionnelles, tels que les détergents MNG (en rouge) ou les amphipols (en vert clair). Ils peuvent également être stabilisés à l'aide de nanodisques (lipides et MSP), structures discoïdales qui constituent un environnement phospholipidique proche de la membrane native. MNG : maltose-néopentylglycol.

tement y manipuler les composants bénéfiques au repliement et à la stabilité des récepteurs recombinants, en particulier des détergents, des liposomes, des amphipols¹ et même des ligands spécifiques. L'efficacité de cette approche, indépendante des contraintes du maintien

¹ Polymères amphiphiles : longues molécules filiformes porteuses de groupes chimiques dont certains sont hydrophiles et d'autres hydrophobes. Les amphipols peuvent se substituer aux détergents à la surface transmembranaire des PMs en leur apportant une sorte de « combinaison de plongée » qui les rend hydro-solubles (source CNRS).

en culture des cellules vivantes ou de la génération d'animaux transgéniques, a été prouvée pour plusieurs RCPG. On peut citer le récepteur ET_A de l'endothéline [17].

Approches de solubilisation et de purification des RCPG

Choix du détergent

La purification d'une protéine membranaire, telle qu'un RCPG, nécessite au préalable une solubilisation des membranes plasmiques [18]. Cette étape est généralement accomplie à l'aide de détergents, surfactants qui solubilisent les lipides et autres molécules hydrophobes et qui sont des petites molécules amphipathiques (Figure 1). Ces détergents désorganisent les membranes tout en mimant un environnement lipidique naturel ce qui permet de maintenir les protéines membranaires en solution. Le succès de la purification d'un RCPG et de sa stabilisation sous forme fonctionnelle dépend directement du (des) détergent(s) utilisé(s) au cours des étapes initiales de solubilisation et des étapes successives de purification [18]. Les détergents utilisés pour solubiliser les membranes ne sont pas forcément les plus appropriés pour stabiliser et cristalliser les RCPG, ce qui peut donc amener à changer de détergent au cours des différentes étapes biochimiques. Pour maintenir un RCPG sous une forme fonctionnelle, il est préférable d'utiliser des détergents non dénaturants (doux) tels que le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propane sulfonate), le DDM (n-dodecyl-β-D-maltopyranoside) et le sodium cholate. Par son effet stabilisant vis-à-vis des RCPG, le cholestérol, qui est un constituant naturel de la membrane plasmique chez les mammifères, peut être ajouté lors de l'étape de solubilisation [19].

Les récepteurs solubilisés ne sont pas des protéines isolées mais plutôt des complexes associant détergents et lipides membranaires [20]. Ces complexes RCPG/détergents/lipides ont des propriétés physicochimiques particulières (diamètre, volume, masse) et ne sont pas nécessairement des particules homogènes. La concentration du (des) détergent(s) détermine la quantité de lipides associée au

RCPG solubilisé. En général, un rapport de poids détergent/protéine de 1/2 est suffisant pour solubiliser les membranes et générer les complexes RCPG. Un rapport plus élevé entraîne la délipidation des RCPG.

Propriétés fonctionnelles et caractérisation des RCPG purifiés

Les RCPG enchâssés dans les micelles de détergent peuvent être purifiés jusqu'à homogénéité sous forme fonctionnelle. On peut mesurer leurs propriétés de liaison par des tests de liaison de radioligands pour calculer un B_{max} expérimental (nombre de sites-récepteurs actifs exprimé en nmoles de récepteur/mg de protéine), ainsi que leurs propriétés d'activation des protéines G par une mesure d'incorporation de nucléotides [21]. Cependant, les RCPG peuvent être solubilisés tout en étant incorrectement repliés, et donc rester non fonctionnels (incapables de lier des ligands et/ou des protéines G). Pour isoler les récepteurs fonctionnels, plusieurs approches sont nécessaires et souvent combinées (Tableau 1).

Depuis la caractérisation des premiers gènes codant pour les RCPG à la fin des années 1980, les techniques de clonage recombinant permettent d'introduire facilement des séquences épitopes à l'extrémité amino- ou carboxy-terminale de chaque récepteur, contre lesquelles des anticorps spécifiques sont développés. L'épitope *Flag*, reconnu par les anticorps M1 et M2, a été positionné par exemple à l'extrémité amino-terminale du β 2AR et permet une purification efficace du récepteur [7]. L'épitope 6×His (constitué de 6 histidines successives) est souvent introduit à l'extrémité carboxy-terminale des RCPG [22]. Le tag 6×His peut être reconnu par un anticorps spécifique, mais plus généralement par les ions nickel. Les ions nickel existent généralement sous forme de complexes Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*) ou Ni-IDA (*nickel-iminodiacetate*). Les anticorps ou les ions nickel sont la plupart du temps greffés sur des résines rendant les approches de purification par chromatographie d'affinité systématiques et quelquefois automatisées. Pour les ions nickel, on parle de chromatographie IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) et c'est aujourd'hui la méthode la plus utilisée par les laboratoires pour purifier un RCPG.

L'accessibilité des épitopes est un critère majeur de réussite dans la purification des RCPG. Si l'épitope est trop proche du cœur transmembranaire du RCPG, il peut être partiellement masqué par la « ceinture » de détergents, et donc être peu accessible à un anticorps ou à une résine d'affinité. Les RCPG dont l'épitope est bien exposé peuvent être purifiés rapidement à l'aide de résines commercialisées sous forme de colonnes (le paramètre d'affinité entre l'épitope et son anticorps ou le nickel est cependant crucial), condition *sine qua non* pour automatiser la procédure de chromatographie. En règle générale, l'accessibilité d'un épitope sera plus difficile si le récepteur est enchâssé dans une « ceinture » de détergents à concentration micellaire critique² (cmc) basse. Cela s'explique directement par la longueur des molécules de détergent et, en conséquence, par le volume de la « ceinture » qu'ils composent : plus la cmc est basse, plus la « ceinture » est large. Il faut donc privilégier des détergents à cmc élevée. De ce point de vue, les amphipols peuvent

représenter une alternative intéressante aux détergents [23]. L'échange d'une micelle de détergents par un amphipol s'applique facilement aux RCPG.

La purification IMAC ne discrimine pas les récepteurs fonctionnels des récepteurs inactifs. Une deuxième étape s'avère donc indispensable, quoique certains récepteurs aient été purifiés quasiment à homogénéité en une étape IMAC unique. Celle-ci est en général une chromatographie d'affinité mettant en jeu une résine sur laquelle a été greffé un ligand spécifique du récepteur cible (étape de purification fonctionnelle). Par exemple, une résine alprénolol (antagoniste β -adrénergique), une résine neurotensine (agoniste) ou une résine XAC (*xanthine amine congener*, antagoniste) ont été développées pour purifier à homogénéité les récepteurs β 2AR, NTS1 et A_{2A} respectivement [19, 24, 25]. À noter que certains ligands peuvent être couplés à une biotine sans entraîner une perte d'affinité, et donc permettre la purification de leurs récepteurs spécifiques par l'utilisation d'une résine avidine. C'est le cas par exemple du récepteur PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) purifié à l'aide d'un ligand PACAP38 biotinylé [26].

Une purification de type chromatographie d'exclusion (filtration sur gel) peut s'avérer tout à fait complémentaire aux approches de chromatographie d'affinité. En effet, le passage d'une préparation de RCPG à travers une colonne de filtration sur gel très résolutif peut séparer les constituants de l'échantillon selon leurs propriétés physicochimiques (diamètre, volume, masse). Ce type d'approche permet d'isoler, par exemple, un récepteur monomérique de ses dimères, mais aussi d'éliminer des agrégats non fonctionnels.

L'accumulation d'un RCPG en corps d'inclusion chez la bactérie constitue un cas particulier [27]. Les corps d'inclusion n'ont rien à voir avec une membrane biologique et ne peuvent pas être dissociés à l'aide de détergents doux. Seuls des détergents ioniques « décapants » tels que le sodium dodécyl sulfate (SDS), le n-lauroyl sarcosine, ou des agents chaotropes comme l'urée et le guanidinium hydrochloride, solubilisent les corps d'inclusion. Mais ils entraînent systématiquement la dénaturation de la protéine recombinante. Une étape de renaturation au cours de laquelle l'agent dénaturant est remplacé par un détergent doux ou un amphipol doit donc être mise au point [28], et la fonctionnalité du RCPG vérifiée.

Fragilité des RCPG et systèmes de stabilisation *in vitro*

Pour empêcher que les protéines membranaires ne s'agrègent pendant l'étape de solubilisation des

² La cmc correspond à la concentration au-dessus de laquelle les molécules de détergent s'associent pour former des micelles ; en dessous, elles restent sous une forme libre et monomérique.

membranes, la concentration utile en détergent doit être supérieure à sa cmc, ce qui implique la présence de micelles libres uniquement constituées de molécules de détergent (*Figure 1*). Or, une exposition prolongée vis-à-vis de ces conditions est délétère pour la plupart des protéines membranaires et conduit à leur dénaturation progressive et, *de facto*, à une perte de fonction. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'effet dénaturant des détergents. Des lipides et des cofacteurs essentiels au maintien de la conformation active des protéines peuvent être piégés dans les micelles libres. Ainsi, des contacts structurants de type protéine/lipide et-ou protéine/protéine peuvent être rompus par le détergent. Enfin, la structure micellaire ne mime que très imparfaitement l'environnement membranaire (absence de pression latérale qui contribue au maintien de la structure 3D des protéines).

Diverses stratégies ont été imaginées pour améliorer la stabilité des RCPG purifiés. Certaines consistent à modifier les protéines elles-mêmes, d'autres le surfactant utilisé pour les maintenir en solution. La première approche, que nous ne détaillerons pas ici, repose sur la mutation aléatoire de multiples résidus du RCPG en vue d'améliorer sa stabilité dans les détergents. Elle est couramment utilisée en biochimie et biophysique. Cette méthode a été employée avec succès, dans le cas des récepteurs $\beta 1AR$, A_{2A} de l'adénosine et NTS1 de la neurotensine, notamment [29-31]. La seconde approche consiste à modifier l'environnement de la protéine. Il s'agit dans ce cas d'utiliser des milieux qui permettent de maintenir la structure native du récepteur mieux que ne le font les détergents classiques. Il est par exemple possible de compléter le détergent par des lipides susceptibles de rétablir les contacts protéine/lipide, importants pour le bon repliement du récepteur. Ainsi, l'addition de cholestérol et de certains de ses dérivés (cholestérol hémisuccinate) améliore de façon considérable la stabilité des RCPG purifiés [32]. Une autre possibilité consiste à identifier des surfactants originaux mieux à même de préserver le repliement 3D du récepteur. Parmi ces surfactants, se trouvent des molécules qui se rapprochent des détergents par leur taille et leur comportement physicochimique en solution (formation de micelles), des systèmes qui miment au plus près la structure membranaire native (bicelles, nanodisques) ou encore des molécules de structure polymérique (amphipols).

Stabilisation par le maltose-néopentylglycol

Dans la première catégorie de molécules se trouvent notamment les MNG (maltose-néopentylglycol) [33]. Ces composés sont des détergents originaux qui ont pour principale caractéristique la présence d'un carbone quaternaire central qui restreint la flexibilité conformationnelle de la molécule. Ils permettent, d'une part, d'extraire la protéine d'intérêt de la membrane mais, qui plus est, de la stabiliser en solution bien mieux que ne le font les détergents classiques (*Figure 1*). Les MNG ont ainsi été utilisés pour purifier et cristalliser le complexe entre le $\beta 2AR$ et la protéine Gs [34]. Parmi les autres surfactants originaux se trouvent les composés fluorés et hémifluorés [35]. Ces composés présentent une structure chimique proche de celle des détergents classiques, à l'exception du fait que leur chaîne hydrocarbonée contient des atomes de fluor. La faible miscibilité des alcanes et des

alcanes perfluorés empêche la partition des lipides et des cofacteurs lipidiques dans ces surfactants, réduisant ainsi la dénaturation de la protéine d'intérêt. Si l'effet stabilisant de ces molécules a été démontré pour de nombreuses protéines membranaires intégrales, leur application aux RCPG reste à ce jour limitée. D'autres surfactants originaux ont été décrits, tels que des composés bicaténaires mimant la structure des phospholipides membranaires ou encore des composés de type lipopeptide. Ces molécules ont permis de maintenir certaines protéines membranaires en solution, mais l'extension aux RCPG reste encore anecdotique [36].

Stabilisation par les bicelles et nanodisques

Une autre possibilité pour stabiliser le repliement natif des récepteurs en solution consiste à employer des systèmes qui miment au plus près la membrane. Les plus répandus sont les bicelles et les nanodisques. Les bicelles sont des structures discoïdales composées d'une bicouche lipidique stabilisée par des lipides à chaîne courte ou par des détergents particuliers. Elles ont été employées pour maintenir en solution de multiples protéines membranaires et quelques RCPG tels que le récepteur 5-HT_{4A} de la sérotonine ou la rhodopsine [37]. Les nanodisques sont également des disques lipidiques, de taille parfaitement contrôlée (*Figure 1*), dont la structure en bicouche est stabilisée non pas par des détergents, mais par des lipoprotéines hélicoïdales appelées MSP (*membrane scaffolding protein*) [38]. Si, dans le cas des bicelles, la taille du disque peut être modulée en faisant varier les rapports entre ses différentes composantes, il existe également des MSP de tailles différentes qui génèrent des disques de diamètre variable mais parfaitement bien défini. Un nanodisque constitue donc un environnement phospholipidique proche de l'environnement natif qui permet, de plus, un contrôle strict de l'état oligomérique de la protéine. La facilité de manipulation des nanodisques, ainsi que la stabilité et le maintien de la fonction biologique de la protéine insérée dans cette structure, rendent leur utilisation extrêmement attrayante pour l'étude des mécanismes moléculaires responsables de l'activation des RCPG, comme illustré par de récents travaux avec les récepteurs $\beta 2AR$, μ -opioïde, GHS-R1a de la ghréline ou la rhodopsine [39].

Stabilisation par les amphipols

La dernière classe de surfactants que nous mentionnons ici est celle des amphipols [23, 40]. Les amphipols sont des polymères amphiphiles, de longueur et de composition bien définies, qui forment un complexe stable avec la protéine membranaire et la maintiennent ainsi en



solution sans la dénaturer (Figure 1). Différentes catégories de polymères ont été développées au cours des dernières années qui varient par leurs propriétés physicochimiques. Outre leur facilité d'utilisation, l'avantage de ces composés est que, contrairement aux détergents classiques, le complexe protéine/amphipol est suffisamment stable et autorise l'absence de toute molécule de polymère libre. Ainsi, la protéine stabilisée par les amphipols se comporte quasiment comme une protéine hydrosoluble classique, ce qui rend sa manipulation aisée pour des études fonctionnelles et structurales. Il faut souligner que les amphipols peuvent être utilisés non seulement pour maintenir le repliement natif de certains RCPG en solution, mais également pour les renaturer efficacement *in vitro*, dans le cadre de stratégies fondées sur l'expression des récepteurs dans les corps d'inclusion bactériens (voir plus haut) [41].

Conclusions et perspectives

Même s'il n'existe pas de méthode générique d'expression, de purification et de stabilisation des RCPG, certaines approches sont très prometteuses. Les cellules d'insecte ou l'accumulation en corps d'inclusion bactériens représentent des systèmes de production très performants, la chromatographie IMAC est devenue incontournable en matière de purification, enfin les nanodisques s'affirment comme un outil très attractif en termes de stabilité et de maintien de fonction des RCPG purifiés.

Le choix de stratégies optimisées vis-à-vis de chaque RCPG reste un défi, que les perspectives d'étude soient structurales ou dynamiques. La biologie structurale des RCPG et de leurs complexes est en pleine expansion. Ainsi, le monde des RCPG attend avec impatience la structure 3D d'un récepteur en interaction avec une arrestine ou une RCPG kinase. L'étude de la dynamique des RCPG lors de la liaison de ligands, et des liens qui existent entre changements de conformation et stimulation des voies de signalisation, en particulier pour les agonistes biaisés (ligands analogues capables de stimuler ou d'inhiber uniquement une partie des voies de transduction engagées par le ligand naturel correspondant), est très importante. C'est particulièrement vrai si nous voulons développer des drogues et des médicaments actifs vis-à-vis des RCPG sur une base structurale et rationnelle, pour un effet thérapeutique amélioré et une diminution des effets indésirables.

Enfin, la très grande majorité des approches de production et de manipulation des RCPG ne concerne actuellement que les récepteurs de la classe A (rhodopsine et β 2AR en sont les prototypes). Les RCPG des autres classes (B comme le récepteur de la sécrétine, ou C comme les récepteurs métabotropiques du glutamate), dont beaucoup sont des cibles thérapeutiques majeures, présentent une structure tertiaire plus complexe car ils sont constitués de domaines additionnels, en particulier au niveau des extrémités amino- et carboxy-terminales. Ils sont donc plus difficiles à manipuler et à stabiliser. Aujourd'hui, les étapes de production de plusieurs RCPG de la classe C en cellules d'insecte, de purification par immunochromatographie et de stabilisation en nanodisques sont en cours de développement et progressent avec un

certain succès. Nul doute que des données structurales ou dynamiques pour ces RCPG seront disponibles rapidement. ♦

SUMMARY

Handling G-protein-coupled receptors: expression, purification and *in vitro* stabilization

Among the different classes of integral membrane proteins, G protein-coupled receptors (GPCR) constitute the largest family. They are involved in most essential physiological functions and particularly play a key role in cell-to-cell communication and sensory signal transduction. They represent targets for approximately 30% of currently marketed drugs. In order to better understand their functioning, define their tridimensional structure and develop novel selective and efficient therapeutic compounds, it is crucial to purify these proteins for a full characterization. However, this biochemical step is not trivial since GPCR are present in membranes at very low levels and they require detergents to be extracted from their natural lipid environment and be handled as functional proteins. No universal strategy for GPCR production, purification and stabilization is currently available; each single GPCR possesses a unique set of physicochemical characteristics, preference for some detergents upon solubilization and specific conditions for purification. During the last decade, major breakthroughs regarding overexpression, purification and above all GPCR stabilization, thanks to amphipols and nanodiscs, opened very exciting perspectives for structural and dynamic investigations of these membrane proteins. The aim of this chapter is to provide an overview of the different aspects of GPCR handling. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

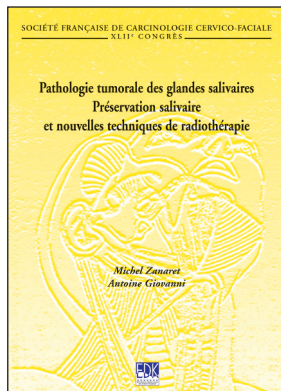
1. White JF, Grishammer R. Automated large-scale purification of a recombinant G protein-coupled neurotensin receptor. *Curr Protoc Protein Sci* 2007 ; chapter 6 : Unit 6.8.
2. Arcemispère L, Sen T, Boudier L, et al. Leukotriene BLT2 receptor monomers activate the Gi2 GTP-binding protein more efficiently than dimers. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 6337-47.
3. Luca S, White JF, Sohal AK, et al. The conformation of neurotensin bound to its G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10706-11.
4. Catoire L, Damian M, Giusti F, et al. Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2. *J Am Chem Soc* 2010 ; 132 : 9049-57.
5. Sarramegna V, Muller I, Mousseau G, et al. Solubilization, purification and mass spectrometry analysis of the human μ -opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2005 ; 43 : 85-93.
6. Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, et al. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 2011 ; 475 : 65-70.

7. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, et al. Crystal structure of the human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* 2007 ; 450 : 383-7.
8. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, et al. Structure of a beta1-adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* 2008 ; 454 : 486-91.
9. Chien EY, Liu W, Zhao Q, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 2010 ; 330 : 1091-5.
10. Wu B, Chien EY, Mol CD, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010 ; 330 : 1066-71.
11. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, et al. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 2008 ; 322 : 1211-7.
12. Standfuss J, Xie G, Edwards PC, et al. Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant. *J Mol Biol* 2007 ; 372 : 1179-88.
13. Hassaine G, Wagner R, Kempf J, et al. Semliki forest virus vectors for overexpression of 101 G protein-coupled receptors in mammalian host cells. *Protein Expr Purif* 2006 ; 45 : 343-51.
14. Eroglu C, Cronet P, Panneels V, et al. Functional reconstitution of purified metabotropic glutamate receptor expressed in the fly eye. *EMBO Rep* 2002 ; 3 : 491-6.
15. Zhang L, Salom D, He J, et al. Expression of functional G protein-coupled receptors in photoreceptors of transgenic *Xenopus laevis*. *Biochemistry* 2005 ; 44 : 14509-18.
16. Li N, Salom D, Zhang L, et al. Heterologous expression of the adenosine A1 receptor in transgenic mouse retina. *Biochemistry* 2007 ; 46 : 8350-9.
17. Junge F, Luh LM, Proverbio D, et al. Modulation of G protein-coupled receptor sample quality by modified cell-free expression protocols: a case study of the human endothelin A receptor. *J Struct Biol* 2010 ; 172 : 94-106.
18. Tate CG. Practical considerations of membrane protein instability during purification and crystallisation. *Methods Mol Biol* 2010 ; 601 : 187-203.
19. Weiss HM, Grishammer R. Purification and characterization of the human adenosine A(2a) receptor functionally expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 2002 ; 269 : 82-92.
20. Grishammer R. Purification of recombinant G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol* 2009 ; 463 : 631-45.
21. Banères JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G protein. *J Mol Biol* 2003 ; 329 : 815-29.
22. Grishammer R, White JF, Trinh LB, Shiloach J. Large-scale expression and purification of a G protein-coupled receptor for structure determination: an overview. *J Struct Funct Genomics* 2005 ; 6 : 159-63.
23. Popot JL, Althoff T, Bagnard D, et al. Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys* 2011 ; 40 : 379-408.
24. Bouvier M, Hnatowich M, Collins S, et al. Expression of a human cDNA encoding the beta-2 adrenergic receptor in Chinese hamster fibroblasts (CHW): functionality and regulation of the expressed receptors. *Mol Pharmacol* 1988 ; 33 : 133-9.
25. White JF, Grishammer R. Stability of the neurotensin receptor NTS1 free in detergent solution and immobilized to affinity resin. *PLoS One* 2010 ; 5 : 12579.
26. Schäfer H, Schmidt WE. Characterization and purification of the solubilized pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide-1 receptor from porcine brain using a biotinylated ligand. *Eur J Biochem* 1993 ; 217 : 823-30.
27. Kiefer H, Krieger J, Olszewski JD, et al. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: purification, reconstitution and ligand binding. *Biochemistry* 1996 ; 35 : 16077-84.
28. Banères JL, Popot JL, Mouillac B. New advances in production and functional folding of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol* 2011 ; 29 : 314-22.
29. Serrano-Vega MJ, Magnani F, Shibata Y, Tate CG. Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 877-82.
30. Lebon G, Warne T, Edwards PC, et al. Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* 2011 ; 474 : 521-5.
31. Shibata Y, White JF, Serrano-Vega MJ, et al. Thermostabilization of the neurotensin receptor NTS1. *J Mol Biol* 2009 ; 390 : 262-7.
32. Gimpl G, Fahrenholz F. Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1564 : 384-92.
33. Chae PS, Rasmussen SG, Rana RR, et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 1003-8.
34. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor Gs protein complex. *Nature* 2011 ; 477 : 549-55.
35. Chabaud, E, Barthélémy P, Mora N, et al. Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants. *Biochimie* 1998 ; 80 : 515-30.
36. Damian M, Perino S, Polidori A, et al. New tensio-active molecules stabilize a human G protein-coupled receptor in solution. *FEBS Lett* 2007 ; 581 : 1944-50.
37. Banères JL, Mesnier D, Martin A, et al. Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 20253-60.
38. Bayburt TH, Sligar SG. Membrane protein assembly into nanodiscs. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 1721-7.
39. Bayburt TH, Leitz AJ, Xie G, et al. Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one or two rhodopsins. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 14875-81.
40. Pocanschi CL, Dahmane T, Gohon Y, et al. Amphipathic polymers : tools to fold integral membrane proteins to their active form. *Biochemistry* 2006 ; 45 : 13954-61.
41. Dahmane T, Damian M, Mary S, et al. Amphipol-assisted *in vitro* folding of G protein-coupled receptors. *Biochemistry* 2009 ; 48 : 6516-21.

TIRÉS À PART

B. Mouillac

Bon de commande



À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris
Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Pathologie tumorale des glandes salivaires** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDK

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |