



**HAL**  
open science

## Les avancées récentes dans le domaine de la biologie structurale des récepteurs couplés aux protéines G de la classe C : Le récepteur métabotropique du glutamate 5

Ludovic Berto, Anaëlle Dumazer, Fanny Malhaire, Giuseppe Cannone, Vinothkumar Kutti, Cyril Goudet, Guillaume Lebon

### ► To cite this version:

Ludovic Berto, Anaëlle Dumazer, Fanny Malhaire, Giuseppe Cannone, Vinothkumar Kutti, et al.. Les avancées récentes dans le domaine de la biologie structurale des récepteurs couplés aux protéines G de la classe C : Le récepteur métabotropique du glutamate 5. *Biologie Aujourd'hui*, 2021, 215 (3-4), pp.85-94. 10.1051/jbio/2021013 . hal-03744975v2

**HAL Id: hal-03744975**

**<https://hal.science/hal-03744975v2>**

Submitted on 10 Nov 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Les avancées récentes dans le domaine de la biologie structurale des récepteurs couplés aux protéines G de classe C: Le récepteur métabotropique du glutamate 5.

Ludovic Berto<sup>1</sup>, Anaëlle Dumazer<sup>1</sup>, Fanny Malhaire<sup>1</sup>, Giuseppe Cannone<sup>2</sup>, Vinothkumar Kutti Rangunath<sup>3</sup>, Cyril Goudet<sup>1</sup>, Guillaume Lebon<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> IGF, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, 34094, Montpellier, France

<sup>2</sup> MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge CB2 0QH, UK

<sup>3</sup> National Centre for Biological Sciences TIFR, GKVK Post, Bellary Road, Bangalore 560065, India

\*Correspondence to: [guillaume.lebon@igf.cnrs.fr](mailto:guillaume.lebon@igf.cnrs.fr)

**Résumé.** La classe C des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) comprend plusieurs membres aux fonctions physiologiques importantes comme par exemple les récepteurs des principaux neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA) du système nerveux, les récepteurs des goûts umami et sucré et les récepteurs sensibles au calcium. Ces récepteurs possèdent une architecture moléculaire particulière, caractérisée par la présence d'un large domaine extracellulaire, qui est soumise à une régulation allostérique fine. De plus, ils forment tous des dimères obligatoires, la dimérisation étant fondamentale pour leur fonction. Comment les changements de conformation induits par la liaison des agonistes au sein du domaine extracellulaire se transmettent à la face interne de ces récepteurs et comment ces mécanismes d'activation peuvent être modulés par des ligands allostériques restent des questions ouvertes. Les progrès récents de la microscopie électronique en conditions cryogénique (cryoEM) ont permis des avancées sans précédent dans le décryptage des bases structurales et moléculaires des mécanismes d'activation des RCPG de classe C, et notamment du récepteur métabotropique du glutamate de type 5 (mGlu<sub>5</sub>). Ils montrent que le glutamate entraîne une fermeture et un changement d'orientation des domaines extracellulaires qui induit en suivant un mouvement important entre les sous-unités, rapprochant les 7TM et stabilisant une conformation 7TM structurellement similaire à l'état inactif. La diversité de conformations inactives pour les classes C était inattendue mais permissive à l'activation par les PAM qui stabilisent une conformation active des 7TM indépendante des changements conformationnels induits par les agonistes, et représentant un mode alternatif d'activation des récepteurs mGlu. Nous présentons et discutons ici les caractérisations structurales récentes des récepteurs de classe C, en soulignant les résultats qui rendent cette famille de récepteurs unique. La compréhension de la base structurale de la signalisation des dimères de mGlu représente une réalisation historique et ouvre la voie à l'analyse de la signalisation des dimères de RCPG en général. Les analyses structurales ouvriront aussi de nouvelles voies pour la conception de médicaments ciblant cette famille de récepteurs qui sont aussi des cibles thérapeutiques.

Mots clés : récepteur métabotropique du glutamate, allostérie, cryo-microscopie électronique, neuroscience, récepteurs couplés aux protéines G

English version.

## **Recent advances in class C G protein-coupled receptor structural biology, the metabotropic Glutamate receptor 5.**

Class C GPCRs that include metabotropic glutamate receptors (mGlu), taste receptors, GABA<sub>B</sub> receptor and Calcium-sensing receptor, are unusual in terms of their molecular architecture and allosteric regulation. They all form obligate dimers, dimerization being fundamental for their function. More specifically, the metabotropic glutamate receptors (mGlu) are activated by the main excitatory neurotransmitter, L-glutamate. mGlu activation by glutamate binding in the venus flytrap domain (VFT) triggers conformational changes that are transmitted, through the Cysteine-Rich Domain (CRD), to the conserved fold of 7 transmembrane helices (7TM), that couples to intracellular G protein. Glutamate activity can also be allosterically modulated by positive (PAM) or negative (NAM) allosteric modulators binding to the 7TM. Recent advance in cryo-electron microscopy (cryoEM) has allowed unprecedented advances in deciphering the structural and molecular basis of their activation mechanism. The agonist induces a large movement between the subunits, bringing the 7TMs together and stabilizing a 7TM conformation structurally similar to the inactive state. The diversity of inactive conformation for the classes was unexpected but allow PAM stabilising a 7TM active conformation independent of the conformational changes induced by agonists, representing an alternative mode of mGlu activation. Here we present and discuss recent structural characterisation of class C mGlu receptors, highlighting findings that make the family of receptor unique. Understanding the structural basis of mGlu dimer signalling represent a landmark achievement and pave the way for structural investigation of GPCR dimer signalling in general. Structural information will open new avenues for structure-based drug design.

Le cerveau humain est composé de milliards de neurones interconnectés par les synapses. Les réseaux de communication neuronaux ainsi formés sont fondamentaux pour les fonctions cérébrales telles que les processus d'apprentissage ou la mémoire. Les synapses sont le lieu d'échanges des molécules de la communication entre les neurones, appelées neurotransmetteurs, tels que le glutamate. Le glutamate, libéré dans la synapse, est capté par des récepteurs membranaires qui participent à la modulation de l'activité neuronale. Parmi ceux-ci, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la classe C jouent un rôle clé dans le fonctionnement synaptique (Gregory and Goudet, 2021). Leur dysfonctionnement étant associé à plusieurs pathologies du système nerveux central, tels que l'autisme, les douleurs chroniques, la maladie de Parkinson, la schizophrénie et bien d'autres encore (Gregory and Goudet, 2021), comprendre leurs mécanismes d'activation à l'échelle atomique est essentiel pour mettre au point de nouveaux médicaments pour traiter ces maladies.

La famille des récepteurs de la classe C se compose de 22 récepteurs différents parmi lesquels les récepteurs métabotropique du glutamate (mGlu) et les récepteurs à l'acide gamma aminobutyrique (GABA<sub>B</sub>) qui sont des récepteurs clés de la neurotransmission, caractéristiques des synapses excitatrices et inhibitrices respectivement (Pin and Bettler, 2016) (**Fig. 1, adapted from GPCRS db, <https://gpcrdb.org/>**, (Kooistra et al., 2021)). Ces récepteurs forment des homo ou hétérodimères obligatoires, la dimérisation étant obligatoire pour leurs fonctions biologiques (El Moustaine et al., 2012). Ils sont composés d'un large domaine extracellulaire bilobé appelé Venus Fly Trap, dans lequel se fixe le GABA ou le glutamate (Pin and Bettler, 2016). Ces domaines VFTs sont de plus responsables de la dimérisation du récepteur de part une interface de dimérisation entre les lobes I et, dans le cas des mGlu la formation d'un pont disulfure entre les deux domaine N-terminals. Chez les mGlu, le VFT est relié au domaine domaine à 7 hélices transmembranaires (7TM) par un domaine rigide et riche en cystéine (CRD). Enchâssé dans la membrane, le domaine 7TM est une caractéristique conservée et partagée par tous les RCPG. Ce domaine est responsable du couplage des RCPG avec les effecteurs intracellulaires que sont les protéines G et les protéines  $\beta$ -arrestines. Il est aussi le lieu de liaison de modulateurs allostériques positifs (PAM) qui augmentent, ou négatifs (NAM) qui diminuent la transduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Gregory and Goudet, 2021).

L'analyse structurale des récepteurs de la classe C a longtemps été limitée au domaine extracellulaire ECD, et plus particulièrement aux VFTs composés des Lobes I et II qui constituent le site de liaison du glutamate (Kunishima et al., 2000; Pin and Bettler, 2016). La structure cristallographique de plusieurs VFTs a été résolue dans les années 2000, démontrant pour la première fois le changement conformationnel et la fermeture du VFT induites par la fixation du glutamate, mais aussi décrivant l'interface de dimérisation entre les deux Lobe-I. La fermeture du VFT induite par la fixation du glutamate est accompagnée par la rotation de l'un par rapport à l'autre suggérant une réorganisation relatives des domaines transmembranaires l'un par rapport à l'autre (Doumazane et al., 2013). La réorganisation de la structure quaternaire des RCPG associé à l'activation du récepteur représente un réel challenge pour une analyse structurale (Doumazane et al., 2013). Une première difficulté réside dans la purification d'un récepteur correctement replié et fonctionnel. Un deuxième challenge est représenté par la multitude de conformations que ces récepteurs peuvent adopter de part leurs propriétés dynamiques. En effet, de manière générale, les RCPG existent à l'équilibre entre leurs états actifs et inactifs (Venkatakrisnan et al., 2013, 2016). La situation est d'autant plus compliquée pour les récepteurs de classe C puisque ces derniers forment des dimères obligatoires, avec une dynamique conformationnelle associée à la structure quaternaire du dimère.

Le développement de méthodologies basées sur l'ingénierie des protéines a permis de modifier les RCPG en introduisant des mutations thermostabilisantes ou en utilisant des protéines de fusions afin de contrôler à la fois la stabilité des récepteurs une fois extraits de la membrane à l'aide de détergents mais aussi de contrôler la flexibilité des du domaines transmembranaires (Rosenbaum et al., 2007; Tate and Schertler, 2009). Ces approches d'ingénierie des protéines ont été clés pour résoudre les structures de récepteurs liés à leurs ligands en utilisant la technique de diffraction des rayons X. Nous disposons maintenant de plus de 300 structures cristallographiques de récepteurs de la classes A principalement mais aussi pour les classes B, F ainsi que les domaine transmembranaires des récepteurs mGlu<sub>1</sub> et mGlu<sub>5</sub> de classe C, qui ont permis de décrire le mode de liaisons des récepteurs liés à leurs ligands mais aussi les changement conformationnels associés qui peuvent y être associés (Hauser et al., 2021).

Dans le cas du récepteur mGlu<sub>5</sub>, les études cristallographiques ont révélé le site de fixation de modulateurs allostériques négatifs ainsi que les résidus clés dans la modulation de l'activation des 7TMs (Doré et al., 2014). Ainsi la structure du 7TM du récepteur mGlu<sub>5</sub> lié au NAM mavoglurant (3aR,4S,7aR)-4-hydroxy-4-[(3-méthylphényl)éthynyl]octahydro-1*H*-indole-1-carboxylate a été résolue à 2.6Å, révélant le site de fixation allostérique localisée and les hélices transmembranaires (TM) TM2, TM3, TM6, TM6 and TM7 (Doré et al., 2014). Ces travaux ont permis de caractériser le site de liaison pour les NAM et ainsi de faciliter l'optimisation et le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutiques (Christopher et al., 2019).

### **Analyse structurale des récepteurs de la classe C en cryo-microscopie électronique**

L'avènement de la technique de microscopie en conditions cryogénique (cryoEM) a permis d'analyser la structure des récepteurs liés à leurs ligands mais aussi en complexes avec leurs effecteurs de signalisation intracellulaires tels que les protéines G mais aussi dans de plus rare cas, avec les protéines arrestines (García-Nafria and Tate, 2020). Cette méthodologie a aussi été le point de départ pour l'analyse structurale et la compréhension de la structure quaternaire des récepteurs dimériques de classe C. En effet, la cryoEM a ainsi permis d'accéder à la structure de récepteur de la classe C qui été réfractaire à la cristallographique des rayons X (García-Nafria and Tate, 2021). Nous disposons maintenant d'un certain nombre de structures de récepteurs de la classe C liés à des activateurs ou à des inhibiteurs mais aussi en complexes avec les protéines G. Ces études structurales des récepteurs mGlu<sub>2</sub> (Lin et al., 2021; Seven et al., 2021), mGlu<sub>4</sub> (Lin et al., 2021), mGlu<sub>5</sub> (Koehl et al., 2019; Nasrallah et al., 2021), GABA<sub>B</sub> (Papasergi-Scott et al., 2020; Park et al., 2020; Shen et al., 2021), et du récepteur calcium (CaSR) (Gao et al., 2021; Wen et al., 2021), combinées à des analyses biophysiques et fonctionnelles, ont permis de comprendre les bases structurales et moléculaires de la signalisation des récepteurs de la classe C (**Fig. 1**).

Le récepteur mGlu<sub>5</sub> est le premier récepteur pour lequel la structure de la forme dimérique a été résolue (Koehl et al., 2019). En plus de révéler l'organisation moléculaire du dimère mGlu<sub>5</sub>, les changements conformationnels induits par la fixation de l'agoniste quisqualate dans le VFT, ont été identifiés. La fermeture des VFT et leurs rotation relatives induit le rapprochement des deux CRD qui vont établir des contacts moléculaire et ainsi stabiliser la conformation active du récepteur (Koehl et al., 2019). Le CRD établie aussi des contacts moléculaires avec la boucle extracellulaire 2 (ECL2) du 7TM, importants et nécessaires à la transmission du signal. Cette interaction entre le CRD et la point de la boucle ECL2 est indispensable à la réorganisation des domaines 7TM. Les 7TM sont séparés dans la conformation inactive, aussi appelée conformation Apo. Lors de l'activation, ils sont soumis à un mouvement de rotation et de translation pour *in fine*, être repositionnés à une distance

suffisante pour établir des contacts moléculaires au niveau de la partie extracellulaire des hélices 6 (Koehl et al., 2019). Cette interaction est nécessaire à la stabilisation de la conformation active du récepteur. Les nouvelles structures des récepteur mGlu<sub>2, 4</sub>, GABA<sub>B</sub> et calcium décrivent un mouvement similaire (Gao et al., 2021; Lin et al., 2021; Mao et al., 2020; Papasergi-Scott et al., 2020; Park et al., 2020; Seven et al., 2021; Shen et al., 2021; Wen et al., 2021).

A l'opposé, l'interaction d'un antagoniste maintient le VFT ouvert et prévient la réorganisation des domaines transmembranaires. Dans la conformation inactive les domaines transmembranaires sont physiquement distants (Koehl et al., 2019; Nasrallah et al., 2021). L'absence d'interactions moléculaire entre les 7TM est caractéristique mais pas spécifique au récepteur mGlu<sub>5</sub> (Du et al., 2021). En effet, alors que leur mécanisme d'activation semble conservé, il existe une diversité de conformations inactives parmi les récepteurs de la classe C. Ainsi, l'absence de contacts moléculaires entre les 7TM est observée pour mGlu<sub>5</sub> (Koehl et al., 2019; Nasrallah et al., 2021), et mGlu<sub>7</sub> (Du et al., 2021) par exemple, alors que pour GABA<sub>B</sub> (Mao et al., 2020; Papasergi-Scott et al., 2020; Park et al., 2020) et mGlu<sub>2</sub> (Du et al., 2021; Lin et al., 2021), les 7TMs forment une interface moléculaire qui stabilise le dimère dans sa conformation inactive. Cette diversité de conformations peut significativement impacter le rôle physiologique de chaque récepteur.

Dans ce contexte, nous avons récemment résolue les structures du récepteur humain mGlu<sub>5</sub>, associé à un antagoniste orthostérique, le LY341494, lié dans les VFTs et à un NAM, MPEP, lié dans les 7TMs (Nasrallah et al., 2021). En parallèle, nous avons aussi résolu la structure du récepteurs lié à un agoniste orthostérique, quisqualate et à une PAM VU0424465 (Nasrallah et al., 2021). En combinant études pharmacologiques et conformationnelles du récepteur, nous avons analysé l'impact des changements conformationnels induits par la fixation des agonistes et des modulateurs allostériques positifs sur la transduction du signal, permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes d'activation du récepteur mGlu<sub>5</sub>.

### Thermostabilisation du récepteur mGlu<sub>5</sub>

Nous avons précédemment décrit l'expression et la purification d'une version tronquée (mGlu<sub>5</sub>-Δ856) du récepteur mGlu<sub>5</sub> humain (Nasrallah et al., 2018) pour laquelle la longueur de l'extrémité C-terminale du récepteur a été réduite. Le rendement de ce récepteur était faible et surtout, le récepteur était plutôt instable dans le détergent dodécyl-β-maltoside (DDM), couramment utilisé pour la caractérisation structurale des RCPG. Pour améliorer à la fois le rendement de mGlu<sub>5</sub> solubilisée et correctement replié, nous avons dans un premier temps augmenté la stabilité thermique du récepteur en détergent, aussi appelée thermostabilité. Ainsi, la conformation du récepteur mGlu<sub>5</sub> sous sa forme dimérique liée au NAM MPEP a été thermostabilisée en introduisant cinq mutations (T742A<sup>5.42</sup>, S753A<sup>5.53</sup>, T777A<sup>6.42</sup>, I799A<sup>7.29</sup>, A813L<sup>7.43</sup>) dans le domaine 7TM du récepteur (Nasrallah et al., 2021) (Fig. 2). Les mutants thermostabilisants ont été identifiés en combinant un test de liaison basé sur l'utilisation d'un radioligand ([<sup>3</sup>H]-MPEP) et la mutagenèse dirigée (Lebon et al., 2011; Magnani et al., 2016). Dans le cadre de cette étude, nous avons criblé 288 mutants simples du domaine 7TM de mGlu<sub>5</sub>. Onze mutants ont d'abord été identifiées et sélectionnées pour leur effet thermostabilisant. Le meilleur mutant simple thermostable A813L (mGlu<sub>5</sub>-1M) affiche un T<sub>m</sub> de 28°C, comparé au récepteur WT qui a un T<sub>m</sub> de 20°C (Fig. 2.). A813L a ensuite été combiné avec quatre autres mutants thermostabilisants, T742A<sup>5.42</sup> (TM5), S753A<sup>5.53</sup> (TM5), T777A<sup>6.42</sup> (TM6), et I799A<sup>7.29</sup> (TM7), en fonction de leurs propriétés additives pour donner la construction nommée mGlu<sub>5</sub>-5M (Fig. 2). Cette construction mGlu<sub>5</sub>-5M présente une stabilité thermique améliorée de ~20°C dans les détergents couramment utilisé pour les études structurales tel que MNG3 (T<sub>m</sub> apparent = 41°C) (Fig. 2) ou DDM lorsqu'elle est liée au [<sup>3</sup>H]-MPEP (Nasrallah et al., 2021). Le récepteur mGlu<sub>5</sub>-5M conserve sa pleine capacité à activer la protéine G par rapport au récepteur

de type sauvage (WT). Le récepteur mGlu<sub>5</sub>-5M thermostabilisé a été exprimé et purifié jusqu'à homogénéité. Nous avons observé des particules isolées dans la glace amorphe nécessaire à la réalisation de l'analyse structurale en utilisant la cryoEM (**Fig3**).

Le processus d'identification des mutations thermostabilisantes nous a aussi permis d'évaluer l'effet du domaine extracellulaire ECD sur la stabilité du domaine transmembranaire. L'ECD est composé du VFT et du CRD qui interagit avec des résidus de l'ECL2. Cette interaction a été précédemment montrée comme étant importante pour la médiation de la transduction du signal (Koehl et al., 2019). L'interaction CRD-ECL2 pourrait également contribuer à la thermostabilité du récepteur complet. Nous avons mesuré la thermostabilité du 7TM-5M seul (Nasrallah et al., 2021). La thermostabilité du 7TM-5M est fortement altérée en l'absence du ECD (Nasrallah et al., 2021). Cette observation soutient la contribution du domaine extracellulaire non seulement pour la médiation de la transduction du signal mais aussi pour le maintien de l'intégrité structurale du domaine 7TM nécessaire à sa fonction.

### Analyse structurale du récepteur mGlu<sub>5</sub> par la technique de cryoEM

Sur la base de la construction décrite ci-dessus, la structure cryoEM du récepteur mGlu<sub>5</sub>-5M lié à l'antagoniste orthostérique LY341495 et au NAM MPEP a été déterminée à une résolution globale de 4,0 Å (Nasrallah et al., 2021) (**Fig. 3**). Nous avons aussi déterminé la structure du mGlu<sub>5</sub>-5M lié à l'agoniste quisqualate et à l'ago-PAM de haute affinité VU0424465 à une résolution globale de 3,8 Å (**Fig. 3**). Dans ces deux structures, nous avons obtenu une meilleure résolution pour les VFTs que pour les CRDs ou encore les 7TMs. La résolution plus faible dans les 7TMs ne permet pas d'identifier clairement le mode de liaison des modulateurs allostériques.

Dans le cas de la structure liée à l'antagoniste, nous observons une densité supplémentaire dans chaque VFT, située à la charnière du Lobe-I et du Lobe-II qui est modélisée comme le ligand antagoniste LY341495 (**Fig. 4**). Les interactions entre le LY341495 et le récepteur sont médiées à la fois par le Lobe-I (70% des contacts de résidus) et le Lobe-II (30% des contacts de résidus). Ser152 et Thr175 dans le Lobe-I établissent des liaisons hydrogène avec le groupe amino- et carboxylique substitués sur le carbone-2 du LY341495. Dans le Lobe-II, l'interaction directe du LY341495 avec la chaîne latérale de Tyr223 stabilise une conformation ouverte du Lobe-II par rapport au Lobe-I qui est encore plus grande que celle observée dans l'état apo dans laquelle aucun ligand n'est lié dans le VFT. La liaison simultanée d'un antagoniste dans le site de liaison orthostérique et du MPEP dans les 7TMs abolit la signalisation de la protéine G et l'activité basale de mGlu<sub>5</sub>. Cette structure représente donc la conformation R totalement inactive du récepteur (**Fig. 3**).

Lorsque nous avons effectué une classification 3D du récepteur lié à l'agoniste, une sous-population de récepteurs a été trouvée dans l'état inactif, très probablement dû à la perte du quisqualate. En raison de la faible résolution de la structure obtenue, l'analyse de cette classe n'a pas été poursuivie. Dans l'ensemble, la carte obtenue est similaire à la structure du récepteur mGlu<sub>5</sub> précédemment publiée et liée à un nanobody, au quisqualate et à l'ago-PAM CDPPB (Koehl et al., 2019). Au niveau du site de liaison orthostérique, nous avons constaté que l'agoniste quisqualate interagit avec un ensemble similaire de résidus du Lobe-I que l'antagoniste LY341495, notamment Y64, W100, Ser151, Ser152, Ser173, Ala174 et Thr175. Cependant, la structure planaire du quisqualate permet la stabilisation de la conformation fermée des VFTs alors que le LY341495, une molécule plus grande, empêche la fermeture des VFTs, conduisant à un état ouvert stable.

La résolution des 7TMs est plus faible que celle des VFTs et le modèle dérivé de la structure aux rayons X incluant les chaînes latérales a été placé dans la densité. La résolution plus faible ne permettant pas d'effectuer des comparaisons structurales approfondies, seule une analyse globale a été réalisée. La superposition des structures liées à l'agoniste et de l'état apo

(Koehl et al., 2019) avec la structure de l'état lié au LY341495 (Nasrallah et al., 2021) illustre les différentes dispositions des 7TMs par rapport au mouvement du Lobe-II. Le mouvement du Lobe-II se traduit par les CRDs, ce qui induit le repositionnement des domaines 7TMs (**Fig. 4**). Les 7TMs de l'état lié au LY341495 sont éloignés de  $\sim 26$  Å (mesuré entre  $C\alpha$  de Leu738<sup>5,38</sup> de chaque résidu 7TM) comparé à 21 Å dans l'état apo, (**Fig. 4**). Il n'y a pas de contacts moléculaires entre les 7TM du dimère du récepteur mGlu<sub>5</sub> dans la conformation inactive (**Fig. 4**), similaire à l'état apo précédemment décrit (Koehl et al. 2019). Ceci est différent des interfaces moléculaires entre les 7TMs suggérées pour la conformation inactive de mGlu<sub>2</sub> (Xue et al., 2015) et rapportées pour le récepteur GABA<sub>B</sub> hétérodimérique de classe C (Mao et al., 2020; Papasergi-Scott et al., 2020; Park et al., 2020; Shaye et al., 2020), et peut expliquer les différences dans les propriétés de signalisation des divers récepteurs de classe C. Dans son état inactif, chacun des 7TM des protomères du récepteur mGlu<sub>5</sub> est une entité isolée.

Dans la conformation intermédiaire-active, les VFT, les CRD et les 7TM forment un dimère compact du récepteur mGlu<sub>5</sub>, qui stabilise l'interface active des 7TM via des contacts moléculaires TM6-TM6 avec Ile791<sup>6,56</sup> séparés de seulement 6,7 Å, alors que les mêmes résidus sont distants de 41,8 Å et 43,3 Å dans l'état lié au LY341495 et l'état apo, respectivement (Nasrallah et al., 2021) (**Fig. 4**), comme mesuré entre les atomes  $C\alpha$ . Ce large mouvement des 7TM est médié au travers de l'interaction établie par l'ECL2 du 7TM avec le CRD et avec le linker reliant TM1 au CRD. Cette interaction est critique pour traduire les changements conformationnels des VFTs vers les 7TMs et permettre ainsi l'activation des protéines G intracellulaires (Koehl et al., 2019).

La préparation protéique de mGlu<sub>5</sub>-5M liée à un agoniste contient également l'ago-PAM VU0424465, lié aux 7TM. Il existe peu d'informations structurales sur le mode de liaison des PAM dans le domaine transmembranaire du récepteur mGlu<sub>5</sub>. Nous avons observé une forte densité adjacente aux résidus Ser809<sup>7,39</sup>, Trp785<sup>6,50</sup> et Pro655<sup>3,40</sup> correspondant probablement à l'ago-PAM VU0424465. En effet, ces résidus composent en partie la poche de liaison allostérique où les NAM se lient (Christopher et al., 2019; Doré et al., 2014). Cependant, la résolution obtenue est insuffisante pour modéliser et résoudre les détails moléculaires de la liaison des PAMs car la pose du ligand ne peut être attribuée sans ambiguïté. Nous avons aussi identifié une densité supplémentaire sur la surface de TM1 faisant face aux lipides, sur la surface extracellulaire, qui a été modélisée comme étant une molécule de cholestérol hémisuccinate (CHS), qui est présent tout au long de la purification. La molécule de CHS modélisée occupe une position similaire à deux des molécules d'acide oléique modélisées dans la structure aux rayons X de mGlu<sub>5</sub> 7TM (Doré et al., 2014). Le cholestérol est connu pour se lier à la surface exposée aux lipides des récepteurs et pour stabiliser le repliement des récepteurs. Cette observation suggère que la rigidité de la molécule de cholestérol peut également contribuer à stabiliser l'interaction entre TM1, 2 et 3. En conclusion, l'absence de la protéine G nécessaire pour stabiliser la conformation active complète (Venkatakrishnan et al., 2013), suggère que cette structure est susceptible de représenter un état actif intermédiaire du récepteur mGlu<sub>5</sub>.

### **Agonistes et modulateurs allostériques positifs activent différentes conformations de mGlu<sub>5</sub>**

Enfin, nous nous sommes interrogés sur les possibles conséquences fonctionnelles de l'absence de contacts entre les domaines 7TM du récepteur mGlu<sub>5</sub> dans sa conformation inactive. En effet, notre étude qui s'appuie sur un récepteur mGlu<sub>5</sub> thermostabilisé et analysé en détergents confirme les premières observations de l'étude du récepteur mGlu<sub>5</sub> reconstitué en nanodisque (Koehl et al., 2019; Nasrallah et al., 2021)

Deux interactions moléculaires clés expliquent comment le changement conformationnel du VFT peut conduire à l'activation d'au moins un 7TM. La première est



l'interaction entre l'ECL2 et le CRD qui connecte le ECD à la première hélice transmembranaire du 7TM. ECL2 et le CRD forment un pont rigide entre le ECD et le 7TM. Le changement d'orientation par rapport au plan membranaire du CRD résultant de la réorientation des VFT est important pour la stabilisation de la conformation active. En accord avec cette interaction, la mutation de la région apicale de l'ECL2 affecte largement la capacité des VFTs activés à transduire le signal vers les 7TMs (Koehl et al., 2019). La deuxième interaction importante est définie par le contact moléculaire entre les TM6 des deux 7TMs dans la conformation active du récepteur, permettant la stabilisation d'au moins un 7TM dans son état actif, pour finalement conduire à l'activation de la protéine G. Le rôle de cette seconde interaction est soutenu fonctionnellement par l'activité constitutive d'un récepteur dimérique dans lequel les TM6 sont lié par l'intermédiaire d'un pont disulfure (Koehl et al., 2019).

Sur cette base, nous avons examiné si le 7TM individuel du dimère du récepteur mGlu<sub>5</sub>, comme observé dans la conformation inactive du récepteur, peut induire la signalisation de la protéine G lors de l'activation de l'ago-PAM, indépendamment de l'orientation du VFT/CRD par rapport au plan de la membrane et de l'interface du dimère 7TM. De par son activité agoniste intrinsèque, l'ago-PAM VU0424465 peut activer le mGlu<sub>5</sub> (Rook et al., 2013). Nous avons démontré que cette réponse ne peut être que partiellement inhibée par des concentrations saturantes de l'antagoniste compétitif LY341495 qui empêche la fermeture du VFT. Précédemment, il a été rapporté que les VFT ouverts, lié à un antagoniste, peuvent toutefois encore se déplacer et adopter une orientation active, comme l'illustre la structure cristalline du dimère VFT mGlu<sub>1</sub> avec LY341495 lié (PDB : 3KS9). Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ago-PAM VU0424465 induise l'état actif (Kunishima et al., 2000) du dimère VFT. Cependant, cela semble peu probable car le senseur conformationnel du VFT basé sur le signal FRET entre les snap-tags fusionnés à l'extrémité N-terminale et qui permet de suivre les mouvement et l'orientation relative des VFTs (Doumazane et al., 2013), n'a pas révélé de changement de conformation inactive vers l'état actif du VFTs lors de l'activation par VU0424465, en présence de l'antagoniste LY341495. Nous avons ensuite confirmé la capacité du récepteur mGlu<sub>5</sub> à signaler malgré la conformation R inactive au repos de ses VFT. Pour cela, nous avons mesuré l'activation de la protéine G en utilisant une préparation membranaire obtenue à partir de cellules exprimant le récepteur mGlu<sub>5</sub>, excluant ainsi la possibilité que le L-glutamate endogène interfère. Comme anticipé, VU0424465 déclenche l'activation de la protéine G même si les VFT sont stabilisés à l'état inactif par le LY341495 (Nasrallah et al., 2021). Nos travaux ont donc permis de démontrer que l'ago-PAM VU0424465 peut activer les 7TMs même si les VFTs sont maintenus dans leur conformation inactive, indiquant que l'orientation de la liaison rigide CRD-ECL2 nécessaire pour transmettre les changements de conformation des VFTs, n'est pas une condition préalable à l'activation des 7TMs lors de la stimulation par l'ago-PAM VU0424465. En résumé, l'ago-PAM VU0424465 ne nécessite pas la réorganisation de la structure quaternaire induite par les agonistes orthostériques qui rapproche le 7TM, et déclenche la transduction du signal à partir du 7TM isolé en l'absence de glutamate (Nasrallah et al., 2021). Cependant la transduction du signal optimum est obtenue suite à la stimulation du récepteur par un agoniste tel que le quisqualate ou le glutamate, qui tous deux vont stabiliser la conformation active du récepteur dimérique.

### **Mécanisme d'activation des récepteurs de la classe C.**

Enfin les études récentes présentant les structure des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Shen et al., 2021), mGlu<sub>2</sub> (Lin et al., 2021; Seven et al., 2021) et mGlu<sub>4</sub> (Lin et al., 2021), complexés à la protéine G, ont confirmé le mode d'activation asymétrique des récepteurs de la classe C, à savoir qu'un seul protomère peut être lié à une seule protéine à la fois. De plus, cette asymétrie est représenté par un seul modulateur allostérique lié dans le 7TM lui-même couplé à la protéine G. Bien que des changements conformationnels caractéristiques de l'activation soient

identifiables, leur amplitude est modeste notamment au niveau de l'hélice 6, dont le mouvement de la partie intracellulaire est caractéristique du mécanisme d'activation des récepteurs de classe A et B. Pour les récepteurs de la classe C, l'hélice 6 est soumise à une légère translation le long de son axe, mais il n'y a pas de large mouvement de son extrémité extracellulaire comme observé pour les récepteurs de classes A et B (Lin et al., 2021; Seven et al., 2021). Le peptide C-terminale de la sous-unité alpha de la protéine G vient se loger dans un sillon formé par l'hélice 3 et les boucles intracellulaires 1, 2 et 3 (Lin et al., 2021; Seven et al., 2021). Ces différences notables sur le mode de liaison de la protéine G, la conformation active distincte des domaines transmembranaires comparés à la signature moléculaire caractérisée pour les récepteurs des classes A et B ainsi que leur mécanisme d'activation asymétrique font des récepteurs de classes C une famille de récepteurs atypiques. Cela illustre parfaitement la diversité structurale et fonctionnelle des RCPG. Un plus nombre croissant de structures des récepteurs de la classe C, comme cela est maintenant le cas pour les récepteurs des classes A et B, permettra dans le futur une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'activation.

Il aura fallu plus de vingt années pour comprendre les bases structurales de la signalisation des récepteurs de la classe C, depuis la première analyse structurale des VFTs isolés jusqu'à l'obtention des premières structures de récepteurs complets et liés à leur protéine G. Ces études décrivent les changements conformationnels nécessaires à la transduction du signal lorsque le glutamate active les récepteurs. Notamment, l'interaction entre la boucle ECL2 et les CRD est critique pour la transmission du signal du VFT vers les 7TMs. Aussi, l'interaction entre les domaines 7TMs est nécessaire à la stabilisation de l'état active alors que les mGlu semblent adopter plusieurs conformations, indépendantes d'interactions moléculaires entre les domaines 7TMs, à l'état inactif. Cette différence notable est très vraisemblablement source de diversification de la signalisation intracellulaire en conditions physiologiques. Dans le cas du récepteur mGlu<sub>5</sub>, la conformation active associée à la protéine G, les changements conformationnels associés à l'activation de la protéine G ainsi que le site de liaison des modulateurs allostériques positifs restent indéterminés à ce jour.

## Références

- Christopher, J.A., Orgován, Z., Congreve, M., Doré, A.S., Errey, J.C., Marshall, F.H., Mason, J.S., Okrasa, K., Rucktooa, P., Serrano-Vega, M.J., et al. (2019). Structure-Based Optimization Strategies for G Protein-Coupled Receptor (GPCR) Allosteric Modulators: A Case Study from Analyses of New Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGlu5) X-ray Structures. *J Med Chem* *62*, 207–222.
- Doré, A.S., Okrasa, K., Patel, J.C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R.M., Errey, J.C., Jazayeri, A., Khan, S., Tehan, B., et al. (2014). Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature* *511*, 557–562.
- Doumazane, E., Scholler, P., Fabre, L., Zwier, J.M., Trinquet, E., Pin, J.-P., and Rondard, P. (2013). Illuminating the activation mechanisms and allosteric properties of metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E1416-1425.
- Du, J., Wang, D., Fan, H., Xu, C., Tai, L., Lin, S., Han, S., Tan, Q., Wang, X., Xu, T., et al. (2021). Structures of human mGlu2 and mGlu7 homo- and heterodimers. *Nature* *594*, 589–593.
- El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J.-L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2012). Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 16342–16347.
- Gao, Y., Robertson, M.J., Rahman, S.N., Seven, A.B., Zhang, C., Meyerowitz, J.G., Panova, O., Hannan, F.M., Thakker, R.V., Bräuner-Osborne, H., et al. (2021). Asymmetric activation of the calcium-sensing receptor homodimer. *Nature* *595*, 455–459.
- García-Nafria, J., and Tate, C.G. (2020). Cryo-Electron Microscopy: Moving Beyond X-Ray Crystal Structures for Drug Receptors and Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *60*, 51–71.
- García-Nafria, J., and Tate, C.G. (2021). Structure determination of GPCRs: cryo-EM compared with X-ray crystallography. *Biochem Soc Trans* *49*, 2345–2355.
- Gregory, K.J., and Goudet, C. (2021). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CXI. Pharmacology, Signaling, and Physiology of Metabotropic Glutamate Receptors. *Pharmacol Rev* *73*, 521–569.
- Hauser, A.S., Kooistra, A.J., Munk, C., Heydenreich, F.M., Veprintsev, D.B., Bouvier, M., Babu, M.M., and Gloriam, D.E. (2021). GPCR activation mechanisms across classes and macro/microscales. *Nat Struct Mol Biol* *28*, 879–888.
- Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M.J., Chu, M., Kobilka, T.S., Laeremans, T., Steyaert, J., et al. (2019). Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* *566*, 79–84.
- Kooistra, A.J., Mordalski, S., Pándy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., Keserű, G.M., and Gloriam, D.E. (2021). GPCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function. *Nucleic Acids Res* *49*, D335–D343.

- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971–977.
- Lebon, G., Bennett, K., Jazayeri, A., and Tate, C.G. (2011). Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor. *J Mol Biol* 409, 298–310.
- Lin, S., Han, S., Cai, X., Tan, Q., Zhou, K., Wang, D., Wang, X., Du, J., Yi, C., Chu, X., et al. (2021). Structures of Gi-bound metabotropic glutamate receptors mGlu2 and mGlu4. *Nature* 594, 583–588.
- Magnani, F., Serrano-Vega, M.J., Shibata, Y., Abdul-Hussein, S., Lebon, G., Miller-Gallacher, J., Singhal, A., Strege, A., Thomas, J.A., and Tate, C.G. (2016). A mutagenesis and screening strategy to generate optimally thermostabilized membrane proteins for structural studies. *Nat Protoc* 11, 1554–1571.
- Mao, C., Shen, C., Li, C., Shen, D.-D., Xu, C., Zhang, S., Zhou, R., Shen, Q., Chen, L.-N., Jiang, Z., et al. (2020). Cryo-EM structures of inactive and active GABAB receptor. *Cell Res* 30, 564–573.
- Nasrallah, C., Rottier, K., Marcellin, R., Compan, V., Font, J., Llebaria, A., Pin, J.-P., Banères, J.-L., and Lebon, G. (2018). Direct coupling of detergent purified human mGlu5 receptor to the heterotrimeric G proteins Gq and Gs. *Sci Rep* 8, 4407.
- Nasrallah, C., Cannone, G., Briot, J., Rottier, K., Berizzi, A.E., Huang, C.-Y., Quast, R.B., Hoh, F., Banères, J.-L., Malhaire, F., et al. (2021). Agonists and allosteric modulators promote signaling from different metabotropic glutamate receptor 5 conformations. *Cell Rep* 36, 109648.
- Papasergi-Scott, M.M., Robertson, M.J., Seven, A.B., Panova, O., Mathiesen, J.M., and Skiniotis, G. (2020). Structures of metabotropic GABAB receptor. *Nature* 584, 310–314.
- Park, J., Fu, Z., Frangaj, A., Liu, J., Mosyak, L., Shen, T., Slavkovich, V.N., Ray, K.M., Taura, J., Cao, B., et al. (2020). Structure of human GABAB receptor in an inactive state. *Nature* 584, 304–309.
- Pin, J.-P., and Bettler, B. (2016). Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes. *Nature* 540, 60–68.
- Rook, J.M., Noetzel, M.J., Pouliot, W.A., Bridges, T.M., Vinson, P.N., Cho, H.P., Zhou, Y., Gogliotti, R.D., Manka, J.T., Gregory, K.J., et al. (2013). Unique signaling profiles of positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 determine differences in vivo activity. *Biol Psychiatry* 73, 501–509.
- Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Yao, X.-J., Weis, W.I., Stevens, R.C., et al. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318, 1266–1273.
- Seven, A.B., Barros-Álvarez, X., de Lapeyrière, M., Papasergi-Scott, M.M., Robertson, M.J., Zhang, C., Nwokonko, R.M., Gao, Y., Meyerowitz, J.G., Rocher, J.-P., et al. (2021). G-protein activation by a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 595, 450–454.

Shaye, H., Ishchenko, A., Lam, J.H., Han, G.W., Xue, L., Rondard, P., Pin, J.-P., Katritch, V., Gati, C., and Cherezov, V. (2020). Structural basis of the activation of a metabotropic GABA receptor. *Nature* 584, 298–303.

Shen, C., Mao, C., Xu, C., Jin, N., Zhang, H., Shen, D.-D., Shen, Q., Wang, X., Hou, T., Chen, Z., et al. (2021). Structural basis of GABAB receptor-Gi protein coupling. *Nature* 594, 594–598.

Tate, C.G., and Schertler, G.F.X. (2009). Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination. *Curr Opin Struct Biol* 19, 386–395.

Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185–194.

Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Heydenreich, F.M., Flock, T., Miljus, T., Balaji, S., Bouvier, M., Vepriyev, D.B., Tate, C.G., et al. (2016). Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature* 536, 484–487.

Wen, T., Wang, Z., Chen, X., Ren, Y., Lu, X., Xing, Y., Lu, J., Chang, S., Zhang, X., Shen, Y., et al. (2021). Structural basis for activation and allosteric modulation of full-length calcium-sensing receptor. *Sci Adv* 7, eabg1483.

Xue, L., Rovira, X., Scholler, P., Zhao, H., Liu, J., Pin, J.-P., and Rondard, P. (2015). Major ligand-induced rearrangement of the heptahelical domain interface in a GPCR dimer. *Nat Chem Biol* 11, 134–140.

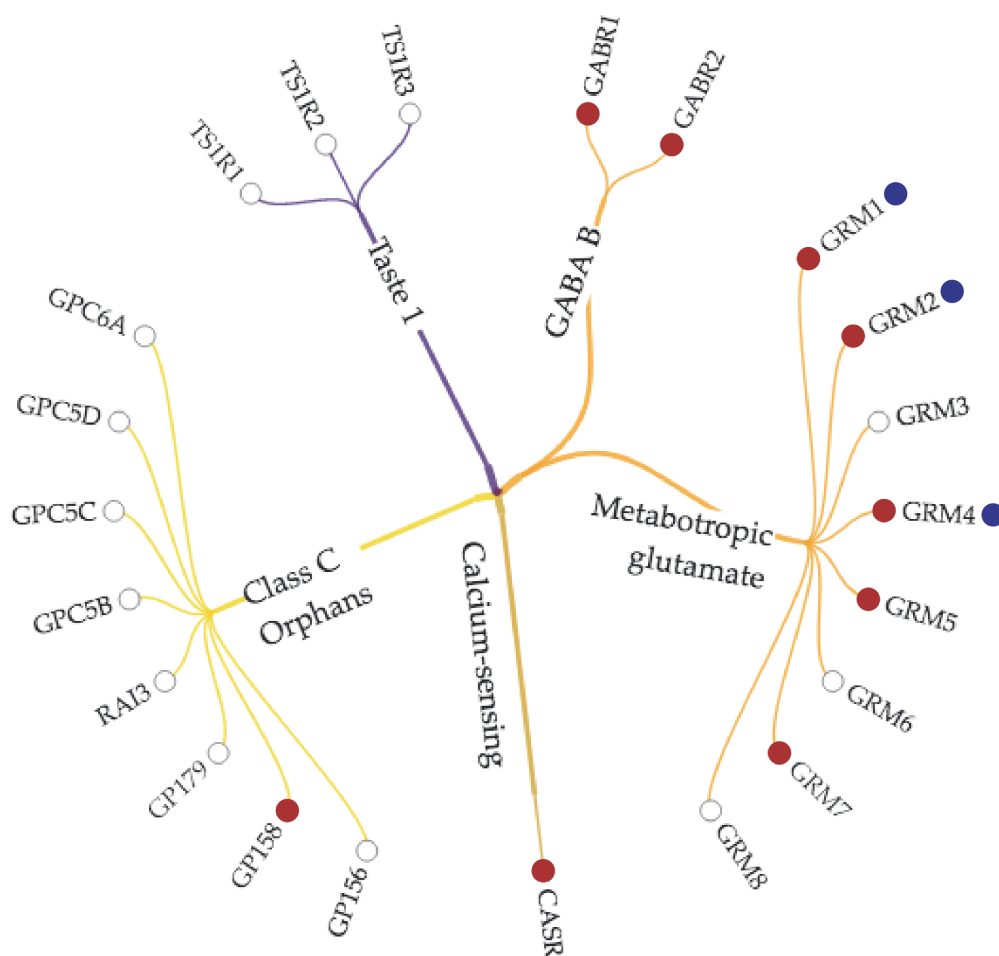
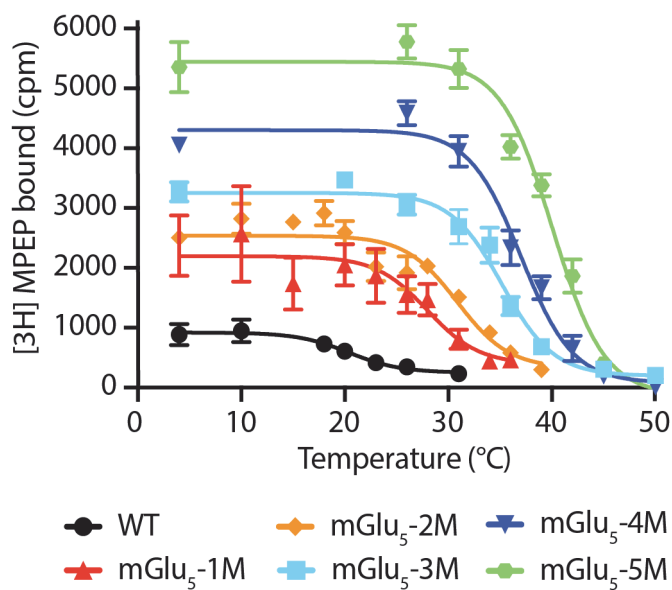


Fig. 1

Fig 1. **Les récepteurs couplés aux protéines G de la classes C.** Les points rouges représentent les récepteurs pour lesquels des structures de leurs formes dimériques ont été résolues. Les points bleus représentent les récepteurs pour lesquels la structure du récepteur en complexe avec les protéines G hétéromérique ont été obtenues. Adapté de GPCR db, <https://gpcrdb.org/>.



**Fig. 2**

Fig 2. **Thermostabilisation du récepteur mGlu<sub>5</sub> dimérique, mGlu<sub>5</sub>-5M.** Cinq mutations ont été combinées pour thermostabiliser la conformation liée au NAM MPEP du dimère du récepteur mGlu<sub>5</sub> humain. Le graphique représente les courbes de liaison du 3H-MPEP en fonction de la température pour le meilleur mutant et les mutants intermédiaires double, triple, quadruple et quintuple thermostabilisés du récepteur mGlu<sub>5</sub>-5M.

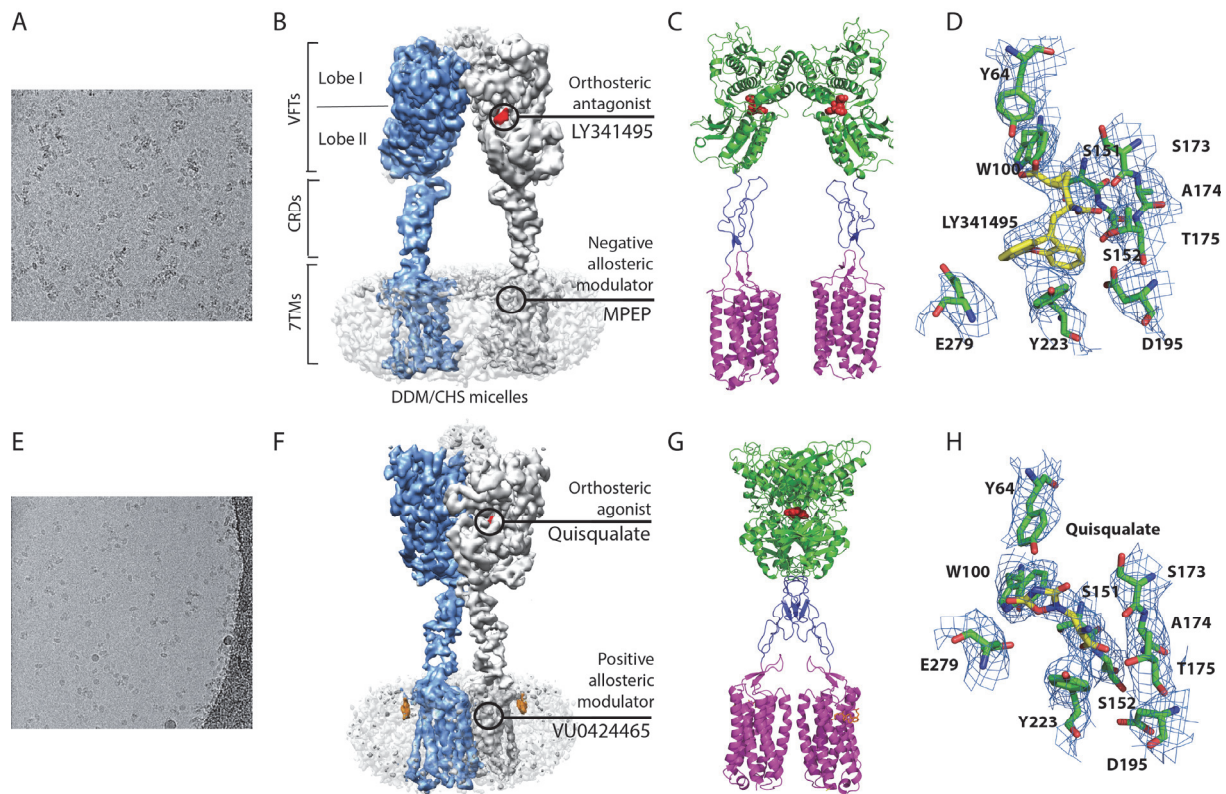


Fig.2

Fig. 3. **Structures cryoEM du récepteur mGlu<sub>5</sub> thermostabilisé.** A et E, micrographes du récepteur mGlu<sub>5</sub> lié à des inhibiteurs ou activateurs respectivement, immobilisé dans la glace amorphe sur des grilles de cryo-microscopie électronique. B et C montrent la carte cryoEM et le modèle du récepteur lié à l'antagoniste orthostérique LY341495 et au NAM MPEP. (D) Densité pour le LY341495 et les résidus environnants dans le VFT. Les panneaux F et G montrent la carte cryoEM et le modèle du récepteur lié à l'agoniste orthostérique quisqualate et au PAM VU0424465. (H) Densité pour le quisqualate et les résidus environnants. Un des monomères du récepteur dans les panneaux B et F est coloré en bleu et l'autre en gris. Les ligands orthostériques sont représentés en rouge. Dans le modèle, les VFTs sont colorés en vert, les CRDs en bleu et les 7TMs en magenta.



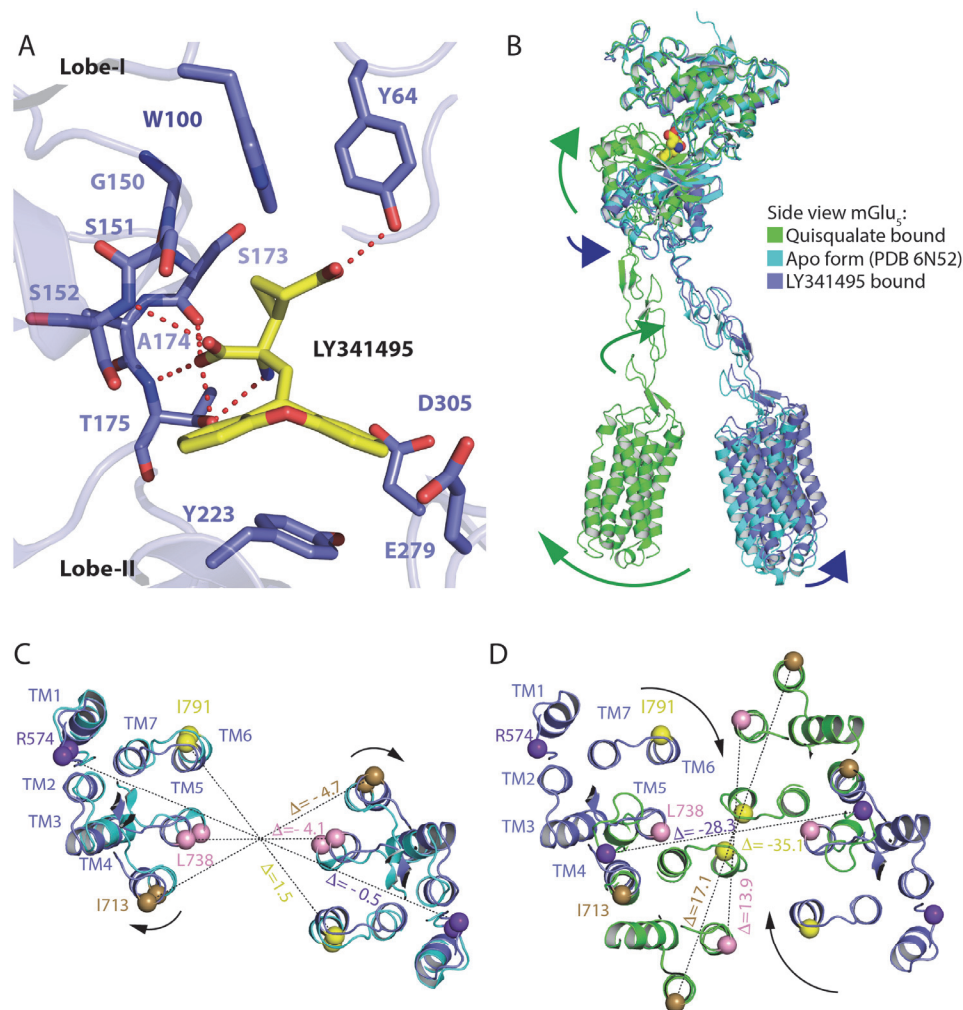


Fig. 4

**Fig. 4. Conformation inactive du récepteur mGlu<sub>5</sub> liée à l'antagoniste orthostérique LY341495.** (A) Site de liaison du ligand du LY341495. (B) Par rapport à l'état apo (cyan ; PDB 6N52), le quisqualate induit la fermeture du VFT (vert), tandis que le LY341495 induit une ouverture supplémentaire (bleu). Dans les deux cas, les changements conformationnels sont transmis par les CRDs rigides aux 7TMs via leur interaction avec la boucle ECL2. (C et D) Repositionnement des 7TMs de la conformation liée au LY341495 et au quisqualate par rapport à la conformation apo inactive. Les valeurs représentées ( $\Delta$ ) correspondent à l'augmentation des distances entre les paires d'atomes C $\alpha$  lors de la transition de l'état inactif à l'état actif.

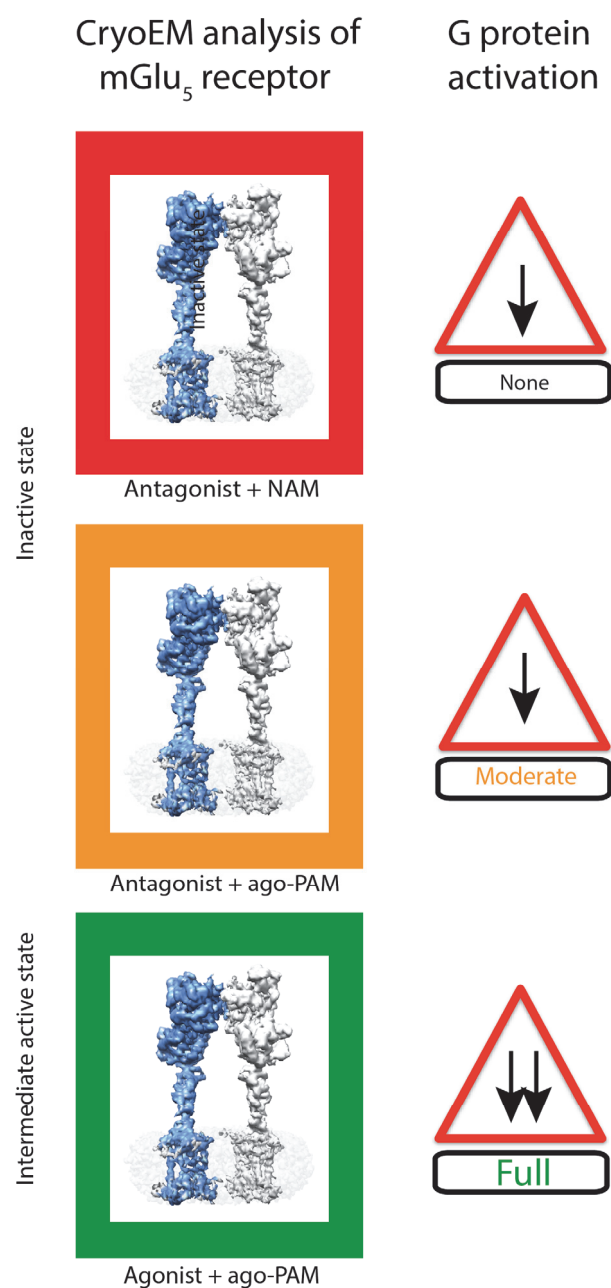


Fig. 5

Fig. 5. **Modèle du mécanisme de signalisation des différentes conformations du récepteur mGlu<sub>5</sub> pour activer la protéine G.**