

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université « Dr. Tahar Moulay » de Saïda**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



Mémoire Élaboré en vue de l'obtention du diplôme Master en  
Biologie

**Spécialité : biochimie**

Présenté par

*Melle. HAMRI Khaoula*

*Melle. FARHI Arbia*

Sur le thème intitulé :

---

***Mécanismes de signalisation des  
protéines G, voies et pathologies. (Méta  
synthèse)***

---

**Soutenu le : 21/06/ 2023**

**Devant la jury composé par :**

Pr. Kahloula.K

Pr. Mostefai. A

Dr.Adli djallel. EH

Pr. Slimani .M

Président

Examinatrice

Examinateur

Encadreur

## **Remerciement**

*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, et la patience pour achever ce travail.*

*Nous exprimons notre gratitude à notre encadreur Mr SLIMANI Miloud, professeur à l'Université TAHAR Moulay Saida, et le remercier d'avoir encadré ce travail.*

*Nous tenons également à lui exprimer notre profonde reconnaissance pour tous les précieux conseils qu'il nous a donné et pour le temps qu'il a consacré pour finir ce travail dans des bonnes conditions.*

*Nous voudrions aussi remercier les membres de notre jury: Pr.Kahloula Khaled, Dr. Adli Djelle Eddine Houari et Pr Mostefai Asma , d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Nous tenant à remercier nos respectueux professeurs tout au long de notre parcours d'étude.*

*En fin à tous nos amis et les personnes qui nous aidé ou soutenu pour la réalisation ce travail et les étudiants de la promotion.*

*Merci à tous*

## *Dédicase*

*C'est avec respect et gratitudes que je tiens à exprimer toutes ma reconnaissance et Sympathie à :*

*Mes chers parents, pour leur amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragé à continuer mes études. Qu'on le bon dieu leur accord une longue vie.*

*Mon cher marié, Fekih. M pour avoir toujours été l'oreille écoutante, pour son aide précieux et sa présence sa patience tous le long de ce travail.*

*Mon chère frère alaa.*

*Mes chères sœurs amira et aridj.*

*À tous mes enseignants, particulièrement mon encadreur Pr SLIMANI.M que je ne remercierai jamais assez, vous serez toujours en ma mémoire, un symbole de sagesse et de bravoure.*

*À ma collègue de travail, Melle FARHI.A, sans oublier mes amies Amina, Nacéra, Hadjer, Amira et Fatima qui m'ont aidé, merci à elles, à leur soutien et leur compréhension.*

*KHAOULA*

**Dédicace:**

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à:*

*Ma mère pour son amour, ses encourage et ses sacrifiées.*

*Mon père pour son affection et la confiance qu'il m'a accordé.*

*Mes chères sœurs Amina et nassima et mes belles nièces*

*Mes freres Yasmine et youcef et Abd al kader et slimane.*

*Ma seule tante Yamina et ses filles, mes tantes et cousines.*

*À tous mes enseignants, particulièrement mon encadreur Pr SLIMANI.M  
pour tout ce qu'il a fait, nous avons eu l'honneur d'etre avec vous*

*Ma deuxième famille Abdelli*

*Mes amis et proches, Nassima, khaoula*

*ARBIA*

## Résumé :

Au cours de cette étude bibliographique, nous avons abordé les caractéristiques des protéines G sous différents aspects structuraux, fonctionnels et leur implication dans les maladies. Elles se composent de trois sous-unités distinctes : alpha, bêta et gamma. La sous-unité  $\alpha$  est la principale composante fonctionnelle de la protéine G et joue un rôle clé dans l'interaction avec les nucléotides GDP (guanosine diphosphate) et GTP (guanosine triphosphate). Le domaine G, qui caractérise la plupart des GTPases, forme le site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides ou mononucleotide-binding domain. Le domaine G est responsable de changements de conformation dépendant des nucléotides : il agit comme un commutateur moléculaire (switch) entre l'état désactivé lié au GDP et l'état activé lié au GTP.

La partie pratique de cette étude vise à approfondir notre compréhension de l'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G et les GDP/GTP par le biais d'une étude de docking moléculaire. Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné trois ligands : le GDP, le GTP et un analogue du GTP non hydrolysable (5'GTP $\gamma$ S). Ces ligands ont été choisis afin d'identifier la composition du site GTPasique de la sous-unité  $\alpha$ , ainsi que la nature des interactions et leurs affinités correspondantes.

L'utilisation du logiciel MOE, nous a permis de prédire les interactions et d'estimer les affinités entre les sous-unités  $\alpha$  et les ligands sélectionnés. L'affinité de liaison ou Score d'amarrage a été évaluée par l'énergie libre de liaison en Kcal/mol.

Le ligand 5'GTP $\gamma$ S a présenté des énergies de liaison de l'ordre de -14.6644 Kcal/mol suivie du GTP de l'ordre -9,5571 Kcal/mol et du GDP de l'ordre de -8.9847 Kcal/mol.

Le site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides ou mononucleotide-binding domain du GDP/GTP est composé de : Ala 48, Glu50, Ser51, Gly52, Lys53, Ser54, Thr55, Arg201, Thr 204, Val224, Glu268. L'ion Mg<sup>2+</sup> est lié au phosphate  $\alpha$ , phosphate $\beta$  Phosphate $\gamma$  du GTP, Et au phosphate $\alpha$ , phosphate $\beta$  du GDP, et au phosphate  $\alpha$  phosphate  $\gamma$  de l'analogue GTP.

Grâce à cette approche, nous avons pu identifier la composition du site GTPasique et caractériser les interactions spécifiques entre les sous-unités  $\alpha$  et les ligands GDP, GTP et analogue du GTP non hydrolysable. Il est important de noter que les résultats de docking ne sont que des prédictions informatiques et doivent être validés expérimentalement. Cependant, les visualisations 2D peuvent aider à comprendre les résultats et à formuler des hypothèses sur les interactions protéine-ligand.

**Mots clés :** GTP, GDP, 5'GTP $\gamma$ S, protéine G hétérotrimérique, récepteur couplé à la protéine G, RCPG, docking, MOE

## Summary :

During this bibliographic study, we approached the characteristics of G proteins under different structural and functional aspects and their implication in diseases. They are made up of three distinct subunits: alpha, beta and gamma. The  $\alpha$  subunit is the main functional component of the G protein and plays a key role in the interaction with the nucleotides GDP (guanosine diphosphate) and GTP (guanosine triphosphate). The G domain, which characterizes most GTPases, forms the site of binding and hydrolysis of nucleotides or mononucleotide-binding domain. activated linked to GTP.

The practical part of this study aims to deepen our understanding of the interaction between the  $\alpha$  subunit and GDP/GTP through a molecular docking study. To carry out this study, we selected three ligands: GDP, GTP and a non-hydrolysable GTP analogue (5'GTP $\gamma$ S). These ligands were chosen in order to identify the composition of the GTPasic site, as well as the nature of the interactions and their corresponding affinities.

The use of the MOE software allowed us to predict the interactions and to estimate the affinities between the  $\alpha$  subunits and the selected ligands. Binding affinity or Docking Score was assessed by binding free energy (Kcal/mol).

The 5'GTP $\gamma$ S ligand exhibited binding energies of -14.6644 Kcal/mol followed by GTP of -9.5571 Kcal/mol and GDP of -8.9847 Kcal/mol.

It is noted that the three ligands present the same interactions with the  $\alpha$ s subunit of 6EG8, the amino acids in common between the two nucleotides and guanine are: Glu268, Ala48 and Glu50, Ribose with Val224, Lys53, Phosphate  $\alpha$  with Glu 50, Ser 51, Arg 201, Lys 53, Thr204. Lys 53, Phosphate  $\beta$  with Ser54, Lys53, Gly52, Ser51, Arg 201, And Phosphate  $\gamma$  with Val 202, Lys 58, Thr55, Arg201(R).

The Mg <sup>2+</sup> ion is bound to the  $\alpha$  phosphate,  $\beta$  phosphate Phosphate $\gamma$  of GTP, and to the  $\alpha$  phosphate,  $\beta$  phosphate of the GDP, and to the  $\alpha$  phosphate  $\gamma$  phosphate of the GTP analogue.

Using this approach, we were able to identify the composition of the GTPasic site and characterize the specific interactions between the  $\alpha$  subunits and the ligands GDP, GTP and non-hydrolysable GTP analog. It is important to note that docking results are only computational predictions and must be validated experimentally. However, 2D visualizations can help understand the results and formulate hypotheses about protein-ligand interactions.

**Keywords:** GTP, GDP, 5'GTP $\gamma$ S, heterotrimeric G protein, G protein-coupled receptor, GPCR, docking, MOE

## ملخص

خلال هذه الدراسة البيليوغرافية، تناولنا خصائص بروتينات G في ظل جوانب هيكلية ووظيفية مختلفة وتأثيرها في الأمراض. وهي مكونة من ثلاث وحدات فرعية متميزة: ألفا وبيتا وجاما. الوحدة الفرعية  $\alpha$  هي المكون الوظيفي الرئيسي لبروتين G وتلعب دورًا رئيسيًا في التفاعل مع الناتج المحلي الإجمالي للنيوكليوتيدات (guanosine diphosphate) و (guanosine triphosphate) GTP يشكل المجال G، الذي يميز معظم GTPases، موقع الارتباط والتحلل المائي للنيوكليوتيدات أو مجال ربط أحادي النيوكليوتيد. تنشيط مرتبط بـ GTP

يهدف الجزء العملي من هذه الدراسة إلى تعميق فهمنا للتفاعل بين الوحدة الفرعية  $\alpha$  و GTP / GDP من خلال دراسة الالتحام الجزيئي. لإجراء هذه الدراسة، اخترنا ثلاثة روابط: الناتج المحلي الإجمالي و GTP و تناظرية GTP غير القابلة للتحلل بالماء (5'  $\gamma$ -GTP). تم اختيار هذه الروابط من أجل تحديد تكوين موقع GTPasic، وكذلك طبيعة التفاعلات والصلات المقابلة لها

سمح لنا استخدام برنامج MOE بالتنبؤ بالتفاعلات وتقدير أوجه التشابه بين الوحدات الفرعية  $\alpha$  والروابط المحددة. تم تقييم تقارب الربط أو درجة الإرساء عن طريق الطاقة الحرة الملزمة (Kcal/mol).

أظهر 5'  $\gamma$ -GTP ligand طاقات ربط تبلغ -14.6644 Kcal/mol تليها GTP من -9.5571 Kcal/mol والناتج المحلي الإجمالي البالغ -8.9847 Kcal/mol.

يلاحظ أن الروابط الثلاثة تقدم نفس التفاعلات مع الوحدة الفرعية  $\alpha$  لـ EG86، والأحماض الأمينية المشتركة بين النيوكليوتيدات والجوانين هي: Glu268 و Ala48 و Glu50 و Ribose مع Val224 و Lys53 و Phosphate  $\alpha$  مع Glu 50 و Ser 51، Arg 201، Lys 53، Lys 53، Thr204. فوسفات  $\beta$  مع Ser54، Lys53، Gly52، Ser51، Arg 201، والفوسفات  $\gamma$  مع Val 202، Lys 58، Thr55، Arg201 يرتبط أيون  $Mg^{2+}$  بالفوسفات  $\alpha$  و  $\beta$  فوسفات الفوسفات من GTP و  $\alpha$  فوسفات و  $\beta$  فوسفات الناتج المحلي الإجمالي و  $\alpha$  فوسفات  $\gamma$  فوسفات من نظير GTP.

باستخدام هذا النهج، تمكنا من تحديد تكوين موقع GTPasic وتوصيف التفاعلات المحددة بين الوحدات الفرعية  $\alpha$  و ligands الناتج المحلي الإجمالي و GTP و GTP التناظرية غير القابلة للتحلل بالماء. من المهم ملاحظة أن نتائج الإرساء ليست سوى تنبؤات حسابية ويجب التحقق من صحتها بشكل تجريبي. ومع ذلك، يمكن أن تساعد التصورات ثنائية الأبعاد في فهم النتائج وتشكيل فرضيات حول تفاعلات البروتين الرابط.

الكلمات الرئيسية: GTP، GDP، 5'  $\gamma$ -GTP، بروتين G الثلاثية، مستقبلات البروتين G، GPCR، الإرساء، MOE.

**SOMMAIRE:**

*Remerciement*

*Dédicace*

**SOMMAIRE:**

**Liste des abréviations :**

**Liste des figures :**

**Listes des tableaux :**

<b>Introduction :</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b> .....	1
<b>1.Description des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG)</b> .....	2
<b>1.1. Structure des RCPG :</b> .....	2
<b>1.2.Classification des RCPG :</b> .....	6
<b>1.2.1La famille des récepteurs au glutamate :</b> .....	6
<b>1.2.2.La famille de la rhodopsine :</b> .....	7
<b>1.2.3. La famille des récepteurs d'adhésion :</b> .....	9
<b>1.2.4. La famille des récepteurs Frizzled/TAS2 :</b> .....	9
<b>1.2.5. La famille des récepteurs à la sécrétine (secretin like) :</b> .....	10
<b>2.Description des protéines G :</b> .....	11
<b>2-1 structure des protéines G</b> .....	11
<b>2.2. Modèle d'activation des GPCR :</b> .....	13
<b>2.3. Le cycle d'activation de <math>G\alpha</math> :</b> .....	15
<b>2.4.Diversité des protéines G hétérotrimériques :</b> .....	19
<b>2.5.Effecteurs de la Protéine G :</b> .....	22
<b>2.5.1. L'adénylate-cyclase (AC) :</b> .....	22
<b>2.5.2. La phosphodiesterase (PDE) :</b> .....	24
<b>2.5.3La phospholipase C (PLC) :</b> .....	25
<b>3.Différents états conformationnelles d'un récepteur.</b> .....	27
<b>3.1. Régulation par les RGS (Regulator of G protein Signalling) :</b> .....	31
<b>3.2. Désensibilisation des RCPG :</b> .....	33
<b>4.Les protéines G monomériques :</b> .....	36
<b>4.1. Les petites protéines G :</b> .....	36

4.1.1. La famille des RHO GTPase : .....	36
4.1.2. La famille des Ras GTPase : .....	37
4.1.3. La famille des Ran GTPases : .....	37
4.1.4. Les familles des RabGTPase et les Arf/Sar GTPases : .....	38
4.2. Activation et inactivation des petites protéines G : .....	38
4.3. Cycle d'activation et d'inactivation des GTPases de la famille Rho : .....	39
5. Protéine G et pathologies : .....	42
6. Docking moléculaire .....	44
6-1 Les fonctions de scoring : .....	45
6-1 -1 Fonctions de score basées sur un champ de force : .....	45
6-1-2 Fonctions de score empirique : .....	45
6-1-3 Les fonctions basées sur la connaissance « de type knowledge-based » : .....	45
6-2 Nature des forces interactions : .....	46
6-2-1 Interactions électrostatiques : .....	46
6-2-2 Interactions hydrophobes : .....	46
6-2-3 Interactions de Van der Waals : .....	47
6-2-4 Interactions pont-hydrogène : .....	47
6-2-5 Les interactions dipolaires : .....	48
6-2-6 Interactions « $\pi$ - $\pi$ » et « cation- $\pi$ » : .....	48
6-2-7 Les interactions entre systèmes $\pi$ : .....	48
6-2-8 Les interactions cation- $\pi$ : .....	49
6-2-9 Les interactions impliquant des métaux : .....	49
6-3 Energie libre de liaison : .....	50
6-4 Les logiciels de Docking .....	51
7. partie pratique .....	1
7-1 Les outils du docking moléculaire : .....	51
7-1-1 Logiciel de docking : .....	51
7-1-2 : La préparation des structures de la protéine cible et du ligand: .....	51
7.1.3 Docking moléculaire : .....	58
7.2. Résultats: .....	58
7.2.1. Détermination de la séquence primaire de la sous unité $\alpha$ s de la protéine 6EG8 : .....	58
7.2.2. Caractéristiques de la structure secondaire de la sous unité $\alpha$ s de la protéine 6EG8 : .....	59

## **sommaire**

---

<b>7.2.3. Visualisation des interactions de sous unité <math>\alpha</math>s de la 6EG8 avec les ligands dockés :</b>	
.....	62
<b>7.3. Discussion :</b>	73
<b>Conclusion :</b>	81
<b>ANNEXES :</b>	83
<b>Références bibliographiques :</b>	

## Liste des abréviations

---

### Liste des abréviations :

**A** : Alanine (Ala)

**AC** : L'adénylate-cyclase

**AMPc** : l'adénosine monophosphate cyclique

**ATP** : adénosine triphosphate

**BEC** : Boucle extracellulaire

**BIC** : Boucle intracellulaire

**C** : Cysteine (Cys)

**Ca**: calcium

**CRD**: Cysteine riche domaine

**D** : Aspartic Acid (Asp)

**DAG** : diacylglycérol

**E** : Glutamic Acid (Glu)

**F** : Phenylalanine (Phe)

**Frz** : fizzled

**G** : Glycine (Gly)

**GAP** : GTPase-activating protein

**GDI** : GTPase dissociation inhibitors

**GDP** : Guanosine-diphosphate

**GEF** : guanine nucleotide exchange factor

**GIRK**: G protéine-coupled inwardly rectifying

**GTP** : Guanosine-5'-triphosphate

**Gα12/13**: protéin G responsable de l'activité des protéines Rho GEF

**H** : Histidine (His)

**I** - Isoleucine (Ile)

**IP3** : inositol triphosphate

**K** : Lysine (Lys)

## Liste des abréviations

---

**L** - Leucine (Leu)

**M** : Methionine (Met)

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**Mdb**: Molécule data base

**MEC** : membrane extracellulaire

**Mg<sup>2+</sup>** : magnésium

**MIC** : membrane intracellulaire

**MOE** : Molecular Operating Environment

**N** : Asparagine (Asn)

**NCBI**: National Center for biotechnologie information

**P** : Proline (Pro)

**PDB** : Protein Data Bank

**PIP<sub>2</sub>** : phosphatidyl-inositol-4-5-biphosphate

**PLC** : Phospholipase C

**Q** :Glutamine (Gln)

**R** :Arginine (Arg)

**Ran** : protéine nucléaire liée à Ras

**RCPG**: récepteurs couplés aux protéines G

**RGS** : regulator of G protein signaling

**RTK** : récepteur à activité tyrosine kinase

**S** :Serine (Ser)

**SAR** : relations structure-activité

**SAR**: Relation structure activité

**T** :Threonine (Thr)

**TAS<sub>2</sub>**:Taste receptor de type 2

**TM** : transmembranaires

**V** : Valine (Val)

## Liste des abréviations

---

**Vdw** : interactions de van der Waals.

**W** : Tryptophan (Trp)

**Y** : Tyrosine (Tyr)

**$\Delta G$**  : énergie libre de Gibbs

**2D** : bidimensionnel

**3D** : Trois dimensions

**5'GTP $\gamma$ S** : Analogue du GTP non hydrolysable

**6EG8** : code de la protéine G htre ( pdb).

## Liste des figures

---

### Liste des figures :

**Figure 1 :** Illustration de la fonction des RCPG et de la diversité de leurs stimuli.

**Figure 2 :** Structure des RCPGs.

**Figure 3 :** Modèle du complexe RCPG (en rouge) ; protéine G (en vert) construit à partir de la structure cristallographique décrite par Kobila. Position supposée de la membrane est indiquée par les pointillés jaunes. Le ligand extracellulaire est représenté en orange, le GDP en bleu

**Figure 4 :** Représentation schématique des sites de glycosylation et de phosphorylation des RCPGs.

**Figure 5 :** Structure schématique des RCPG

**Figure 6 :** Structure de glucagon-like.

**Figure 7 :** Structure cristallographique du domaine extracellulaire (DEC) du récepteur mGlu1 obtenu sous forme dimérique

**Figure 8 :** Structure de rhodopsine

**Figure 9.** Modèle d'interaction théorique entre un dimère de rhodopsine et la transducine (Gt) like.

**Figure 10 :** Evidences de l'existence de dimères de RCPG.

Structure cristallographique du DEC du récepteur Frizzled, lui aussi dimérique

**Figure 11 :** Structure de secretin like .

**Figure 12 :** Représentation schématique d'une protéine G hétérotrimérique ( $G\alpha\beta\gamma$ ) à la membrane plasmique.

**Figure 13 :** Structure tridimensionnelle du complexe hétérotrimérique  $G\alpha\text{GDP}-G\beta-G\gamma$ 1 (PDB code 1GOT). La sous unité  $\alpha$  est représentée en vert et les sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  en orange et magenta respectivement.

**Figure 14 :** la liaison d'un agoniste sur un récepteur de la famille R provoque la rotation d'un noyau aromatique à l'intérieur du TM6 un changement dans l'angle de l'hélice.

**Figure 15 :** l'activation du récepteur par un agoniste brise le lien ionique entre le TM3 et le TM6 qui maintient récepteur inactif.

**Figure 16 :** Structure d'une protéine G hétérotrimérique

**Figure 17 :** Mécanisme de la transduction du signal et changements conformationnels relatifs du domaine transmembranaire

## Liste des figures

---

**Figure 18** : Mécanisme d'activation des protéines G.

**Figure 19** : Cycle d'activation des RCPG

**Figure 20** : Diversité des protéines G

**Figure 21** : Diversité des protéines G hétérotrimériques et cycle d'activation.

**Figure 22** : régulation d'un Cav2 par les G $\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG.

**Figure 23** : régulation d'un Kir3 par les G $\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG.

**Figure24** : Schématisation des voies de signalisation des protéines G $\alpha$  Schématisation de la signalisation induite par les différentes sous-unités G $\alpha$ , suivant l'activation d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires

**Figure 25** : RCPG et seconds-messagers.

**Figure 26** : schéma de l'activation de la protéine kinase AMPcyclique –dépendante Kinase A.

**Figure 27** : Structure de l'Adénylate Cyclase.

**Figure 28** : RCPG et seconds-messagers. A. Voie de signalisation Phospholipase C

**Figure 29** : activation des différents types de ligands.

**Figure 30** : Présentation des différents types de ligands.

**Figure 31** : Différents modèles proposés pour l'activation des RCPG : activation du récepteur par fixation du ligand A

**Figure 32** : Cycle d'activation d'une protéine G régulé par les protéines RGS.

**Figure 33** : Cycle d'activation et d'inactivation des protéines-G

**Figure 34** : régulation de la signalisation des Protéines

**Figure35** : Exemple dans le cas d'un récepteur couplé à une protéine G. La phosphorylation par des kinases spécifiques facilite l'interaction avec des protéines (arrestines) perturbant le couplage de la protéine G.

**Figure 36** : Schématisation des grandes étapes de la désensibilisation des RCPG.

**Figure 37** : structure des protéines RHO.

**Figure 38** : fonctionnement des protéines Ras-like nuclear protein (Ran).

**Figure 39** : Cycle d'activation et d'inactivation des GTPases de la famille Rho.

**Figure 40** : Changements conformationnels dans les régions de commutation et les molécules d'eau autour du site de liaison aux nucléotides de guanine.

## Liste des figures

---

**Figure 41** : les différentes étapes du docking moléculaire

**Figure 42** : représentation schématique de l'interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique.

**Figure 43** : Schéma d'une liaison d'hydrogène entre deux molécules d'eau.

**Figure 44** : Schéma de l'interaction dipolaires.

**Figure 45** : représentation schématique de l'interaction cation –  $\pi$ .

**Figure 46** : Représentation schématique de la liaison de coordination ligand-ion métallique

**Figure 47** : Structure 3D de la protéine G hétérotrimérique (6EG8).

**Figure 48** : structures chimiques des composés GTP (1), GDP (2) et analogue du GTP non hydrolysable, Guanosine 5'-[ $\gamma$ - thio] triphosphate [GTP $\gamma$ S] (3).

**Figure 49** : Téléchargement de la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8

**Figure 50** : Structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8

**Figure 51** : Représentation en 3D de la sous unité alphas de la protéine 6EG8 préparée grâce au logiciel MOE pour docking moléculaire

**Figure 52**: Représentation en 2D des différentes interactions de Guanosine 5'-[ $\gamma$ -thio] triphosphate ( GTP $\gamma$ S) –sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 .

**Figure 53** : Représentation en 2D des différentes interactions de GTP–sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8

**Figure 54** : Représentation en 2D des différentes interactions de GDP–sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8.

**Figure 55** : Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du Gdp avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.

**Figure 56** : Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du Gtp avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8

**Figure 57** : Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du l'analogue Gtp(5'GTP $\gamma$ S) avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.

**Figure 58** : Visualisation en 3d du docking final par le logiciel MOE.

**Figure 59** : Structure du GTP et du 5GTP $\gamma$ S.

**Figure 60** : Représentation de la structure des petites protéines G.

**Figure 61** : structure de Ras

## Liste des tableaux

---

### Listes des tableaux :

**Tableau 1 :** La composition de la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8.

**Tableau 2 :** classement des poses des ligands dockés.

**Tableau 3 :** les interactions des différents ligands avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.

## **Introduction**

---

### **Introduction :**

La réception des informations et leur décodage par les cellules nécessitent la présence de récepteurs spécifiques présents à l'interface entre le milieu extra- et intracellulaire. Ils existent plusieurs types de récepteurs membranaires différenciés en fonction de leur structure et de leur mode d'action, les récepteurs de type canaux ioniques ou récepteurs ionotropiques et les récepteurs associés à une activité enzymatique ou récepteurs métabotropiques (Schioth et Fredriksson, 2005 ; Audet, 2017)

Les récepteurs métabotropes sont subdivisés en deux grandes classes de récepteurs selon le type d'enzymes associées, les récepteurs tyrosine kinases et les récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) doivent leur appellation à leur capacité de couplage, une fois activés, à des protéines hétérotrimériques liant le GTP. Ces protéines transmettent le signal provenant du récepteur à différents effecteurs intracellulaires permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. Il s'agit de la plus grande famille de récepteurs transmembranaires chez l'humain, représentant 3,4% du génome codant pour des protéines. L'étude de ces récepteurs est de la plus haute importance car plus de 30% des médicaments sur le marché agissent via ceux-ci (Hopkins et Groom, 2002 ; Audet, 2017). En effet, le prix Nobel de chimie 2012 fut attribué à Lefkowitz et Kobilka pour leurs travaux sur la compréhension des fonctions des GPCR (Bockaert and Pin, 1999 ; Gershengorn and Osman, 2001 ; Audet, 2017). Localisés au niveau des membranes plasmiques, ils sont responsables d'une grande variété de réponses cellulaires. Ces récepteurs peuvent être activés par différents ligands, variant de simples photons à des protéines complexes en passant par des ions, des odeurs, des acides aminés, des acides gras, des neurotransmetteurs et des peptides. Ils représentent la cible d'environ 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique (Takeda et al., 2002 ; Wise et al., 2002 Audet, 2017).

Dans cette étude bibliographique nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la reconnaissance et la liaison de ligands par les RCPGs qui est primordial pour le développement de molécules à visée thérapeutique. Cette première partie est consacré principalement aux voies de signalisation et les mécanismes d'activation des protéines G.

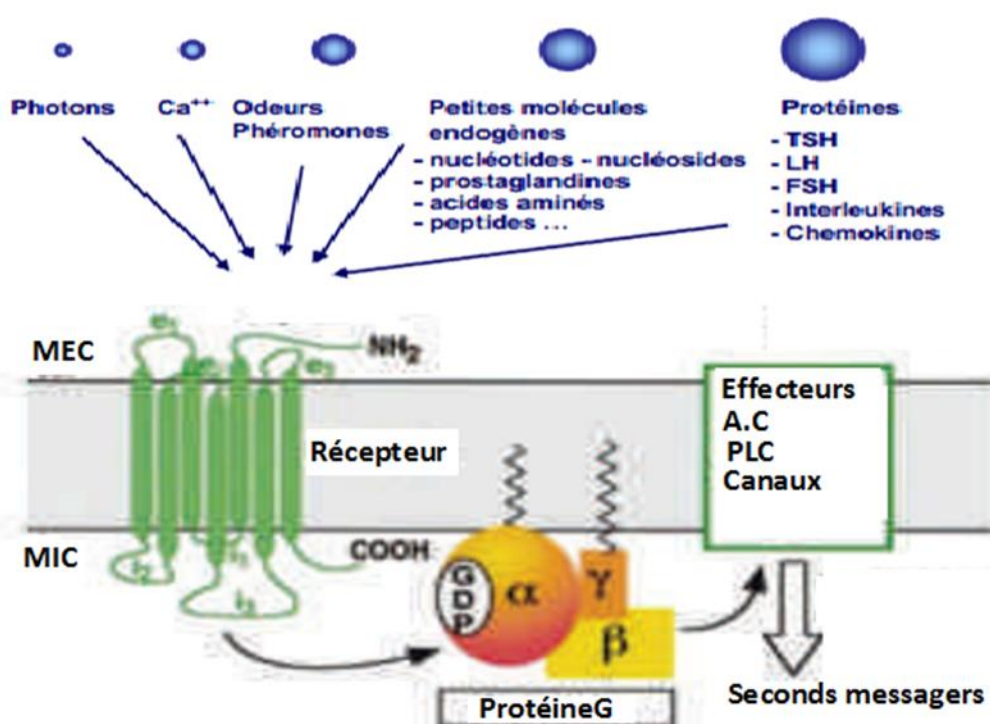
La deuxième partie de notre travail de recherche a porté sur l'étude des caractéristiques de l'interaction entre récepteur (Protéines G) et les ligands (GDP, GTP et analogue de GTP non hydrolysable, 5'GTP $\gamma$ S par l'utilisation du docking moléculaire

## **Revue bibliographique**

## 1. Description des récepteurs couplés à la protéine G (RCPG).

### 1.1. Structure des RCPG :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), famille de protéines à sept hélices transmembranaires couplées à une protéine G, constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez l'Homme (Palczewski et al., 2000 ; Dehbia ,2014). Ces récepteurs peuvent être activés par différents ligands, photons à des protéines, des ions, des odeurs, des acides aminés, des acides gras, des neurotransmetteurs et des peptides (figure1). Ils représentent la cible d'environ 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique (Takeda et al., 2002 ; Wise et al., 2002 Audet,2017).



**Figure 1 :** Illustration de la fonction des RCPG et de la diversité de leurs stimuli.

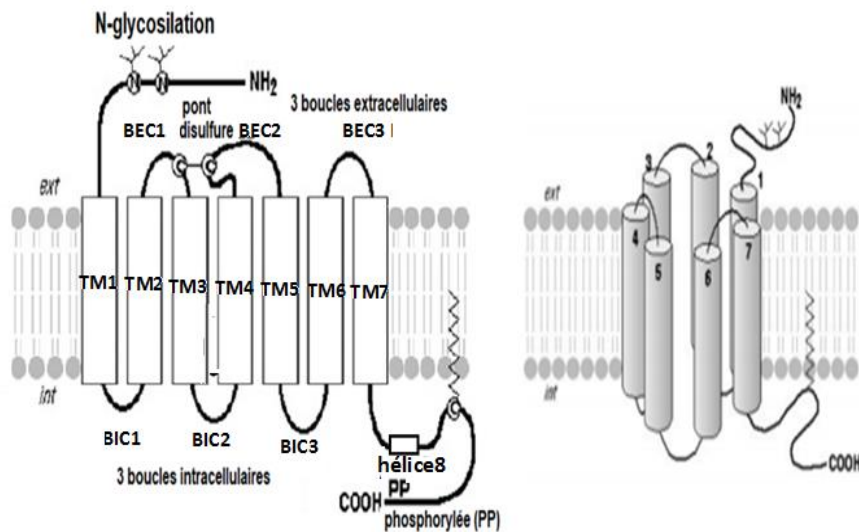
Ce sont des récepteurs membranaires constitués de 7 hélices transmembranaires (TM) connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. La liaison de molécules messages sur la face extracellulaire du récepteur permet l'activation au niveau intracellulaire de protéines G (échange GDP/GTP). Les protéines G, une fois activées, agissent à leur tour sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires. (Maurel et Magnan,2014).

La transmission de la majorité des signaux cellulaires à travers la membrane plasmique se fait par l'intermédiaire des RCPG (Bockaert ,1999 ; audet, 2013). Ainsi, toute perturbation dans leur fonctionnement peut conduire à des pathologies comme l'allergie, l'hypertension artérielle, la maladie d'Alzheimer ou encore la schizophrénie (Gershengorn et Osman ,2001 Klein,2015).

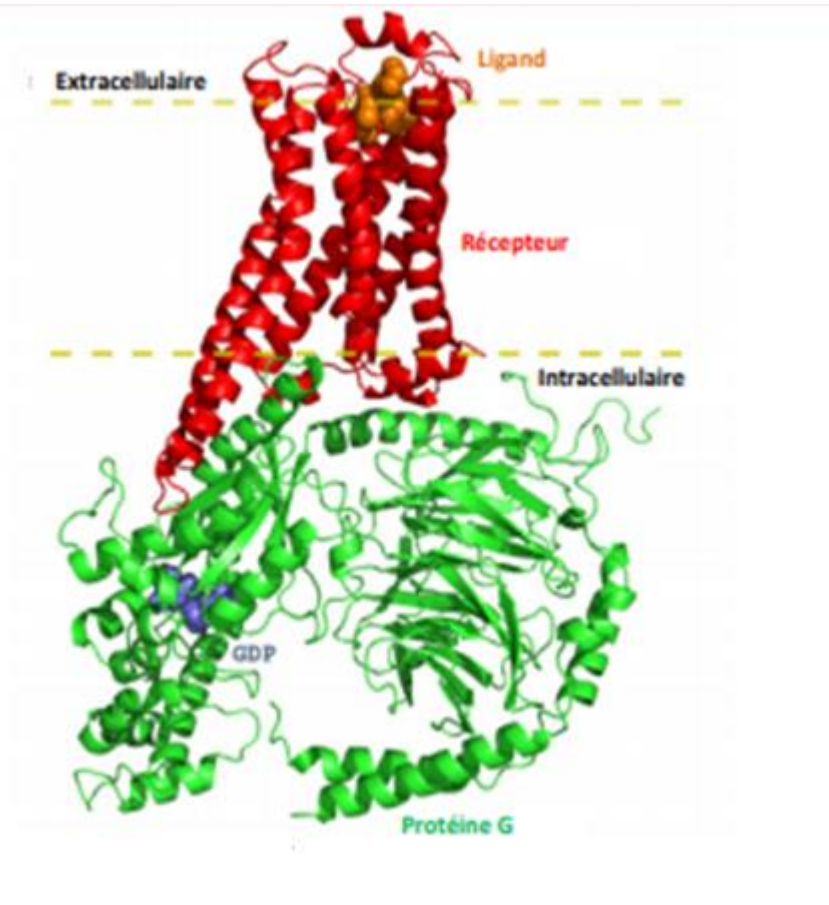
Les récepteurs couplés aux protéines G sont formés de 7 domaines transmembranaires hydrophobes contenant chacun 25 à 35 acides aminés (Figure 2 et Figure 3). Ces 7 domaines hydrophobes sont reliés par 3 boucles d'acides aminés intracellulaires (BIC1, BIC2, BIC3) et 3 boucles extracellulaires (BEC1, BEC2, BEC3) de taille variable (Gether,2000 ; Galzi et Ilien,2019).

L'extrémité N-terminale est extracellulaire, l'extrémité C-terminale intracellulaire. Ils présentent trois boucles extracellulaires (BEC1 à 3) et trois boucles intracellulaires (BIC1 à 3). Un pont disulfure entre les boucles BEC1 et BEC2, des sites de N-glycosylation au niveau du domaine N-terminal. Les extrémités carboxy – terminales. Elles possèdent un site de palmitoylation, qui forme un ancrage lipidique dans la membrane (hélice 8, H8) et créer une quatrième boucle intracellulaire (Gether,2000 ; Pelé, 2018).

Lorsqu'un ligand se lie au domaine extracellulaire du RCPG, cela entraîne un changement conformationnel qui active le domaine intracellulaire du récepteur. Ce domaine intracellulaire interagit ensuite avec les protéines G, qui sont des protéines significatrices qui peuvent activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires, permettant la génération d'une réponse cellulaire appropriée. (Reed et Bourne ,1992 ; Pelé, 2018).



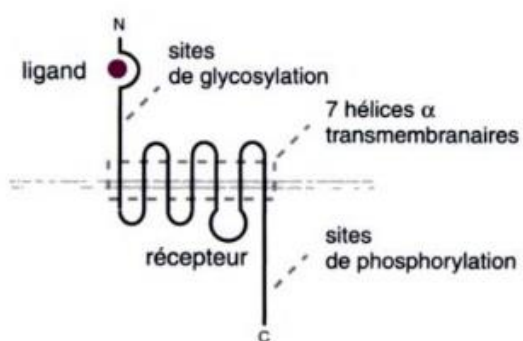
**Figure 2 :** Structure des RCPGs.



**Figure 3 :** Modèle du complexe RCPG (en rouge) ; protéine G (en vert) construit à partir de la structure cristallographique décrite par Kobilka. Position supposée de la membrane est indiquée par les pointillés jaunes. Le ligand extracellulaire est représenté en orange, le GDP en bleu (Louet et al., 2013).

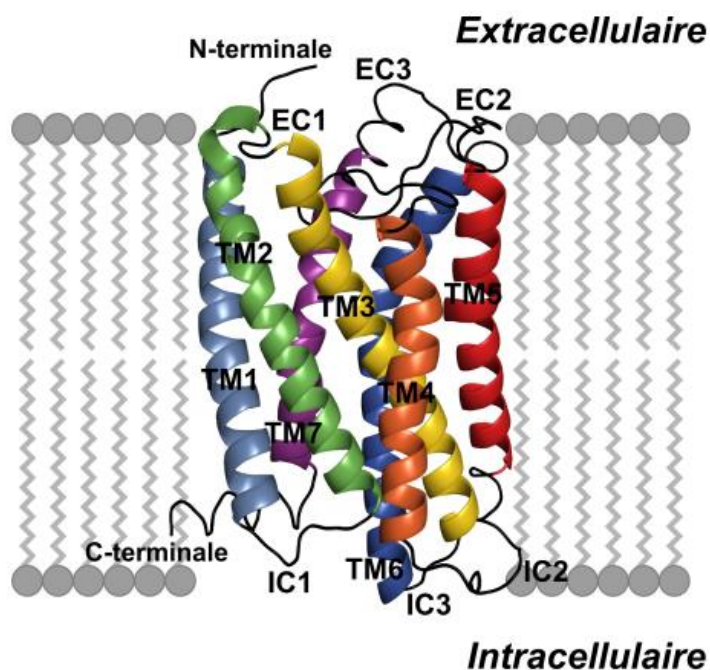
Ces protéines présentent une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires (Reed et Bourne, 1992 ; Pelé, 2018).

L'extrémité N-terminale est extracellulaire portant des sites de glycosylation (figure 4),



**Figure 4 :** Représentation schématique des sites de glycosylation et de phosphorylation des RCPGs.

L'extrémité C-terminale intracellulaire. 7 hélices alpha transmembranaires hydrophobes liées entre elles par des courtes boucles, 3 boucles extracellulaires à la face externe de la membrane plasmique (BEC1 à 3) et 3 boucles intracellulaires à la face interne (BIC1 à 3). La présence d'un pont disulfure entre les boucles BEC1 et BEC2 (Figure 5). Un domaine C terminal permettant un ancrage lipidique dans la membrane, ce qui crée une 4<sup>ème</sup> boucle intracellulaire (hélice8) ; la longueur des domaines N- et C-terminaux et celle des boucles varient selon les récepteurs. (Mobarec et Filizola 2008 ; Pelé, 2018).



**Figure 5 :** Structure schématisée des RCPG

Les hélices correspondent aux différentes HTM : bleu ciel pour l'HTM1, vert pour l'HTM2, jaune pour l'HTM3, orange pour l'HTM4, rouge pour l'HTM5, bleu pour l'HTM6 et magenta pour l'HTM7. Les termes EC1, EC2 et EC3 indiquent l'emplacement des boucles extracellulaires 1, 2 et 3, respectivement. Même chose pour IC1, IC2 et IC3 mais intracellulaires. Les termes N-terminale et C-terminale précisent les positions des 2 extrémités. Figure inspirée de Pelé, 2018.

### 1.2. Classification des RCPG :

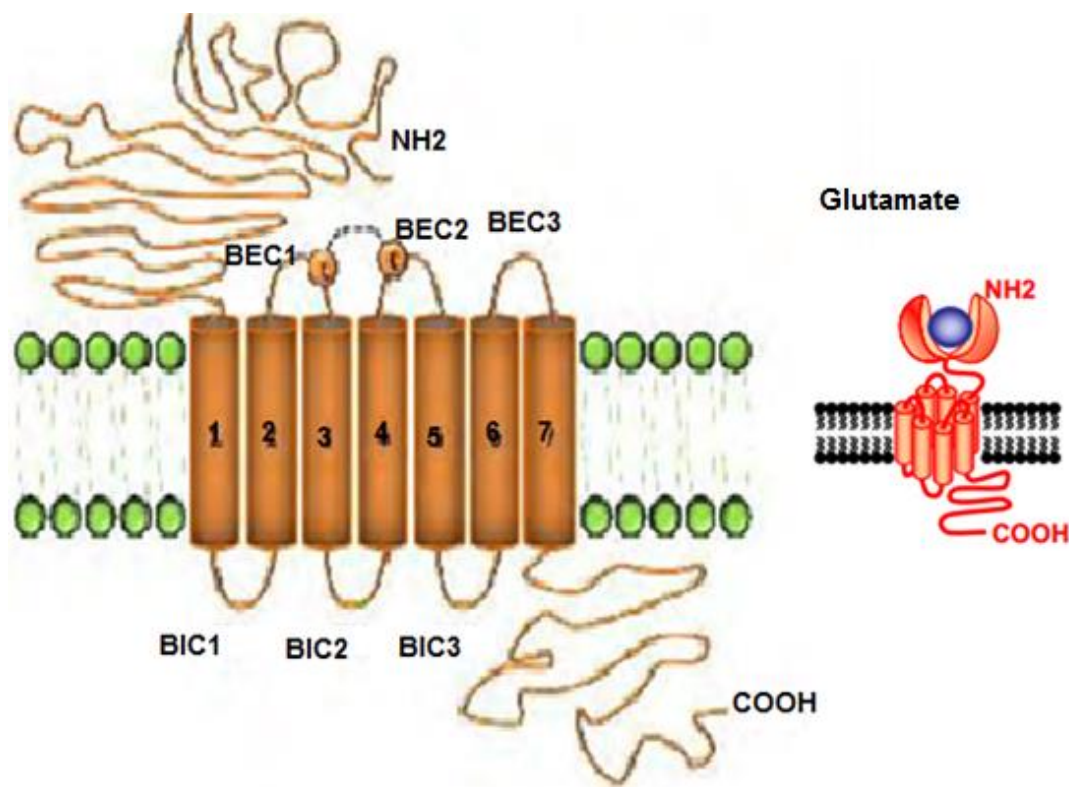
La superfamille des RCPG est l'une des plus importantes familles de protéines chez les vertébrés, avec plus de mille récepteurs différents. Ces derniers présentent une grande diversité en terme de structure et de fonction, tout en partageant des caractéristiques structurales communes. (Bockaert et Pin, 1999 ; Lanier, 2017).

Il existe différentes classifications basées sur des critères variés tels que la séquence, le mode de liaison du ligand, la structure, la phylogénie ou encore la composition en acides aminés (Lew et Thomas, 2002 ; Boussif, 2018).

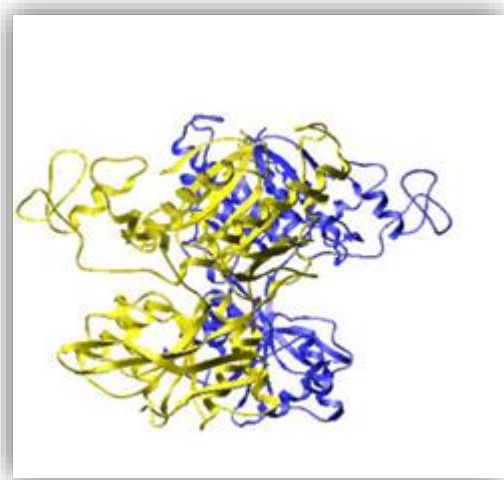
Dans cette étude bibliographique, nous ne détaillerons que la classification établie par Fredriksson et collaborateurs, (2003) reposant sur les liens phylogénétiques entre les différents RCPG, nommée « GRAFS », GRAFS, acronyme des noms des 5 familles (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/taste2, Secretin). (Prossnitz, 2004 ; Salahi, 2014).

#### 1.2.1 La famille des récepteurs au glutamate :

Cette famille comprend les récepteurs métabotropiques au glutamate, les récepteurs à l'acide  $\gamma$ -amino-butérique (GABA), et le récepteur sensible au calcium (CaR) impliqués dans la liaison des molécules gustatives. La liaison du ligand a lieu au niveau de la région N-terminale (Lew et Thomas, 2002 ; Malki, 2016). Celle-ci est de taille importante (280 à 580 acides aminés) et permet de créer une structure bilobée site de fixation du ligand (Bunnett, 2000 ; Marts, 2015). Ces récepteurs ont en commun une région riche en cystéine (CRD) potentiellement importante dans le processus d'activation (figure 6 et 7).



**Figure 06 :** Structure de glucagon-like.



**Figure 7 :** Structure cristallographique du domaine extracellulaire (DEC) du récepteur mGlu1 obtenu sous forme dimérique (code pdb : 1EWV).

### 1.2.2. La famille de la rhodopsine :

Cette classe de RCPG est la plus abondante rhodopsine et les récepteurs aux neurotransmetteurs classiques (amines biogéniques et neurotransmetteurs), aux prostaglandines et les récepteurs d'une large variété de peptides et de neuropeptides. (Siu et al,2013).

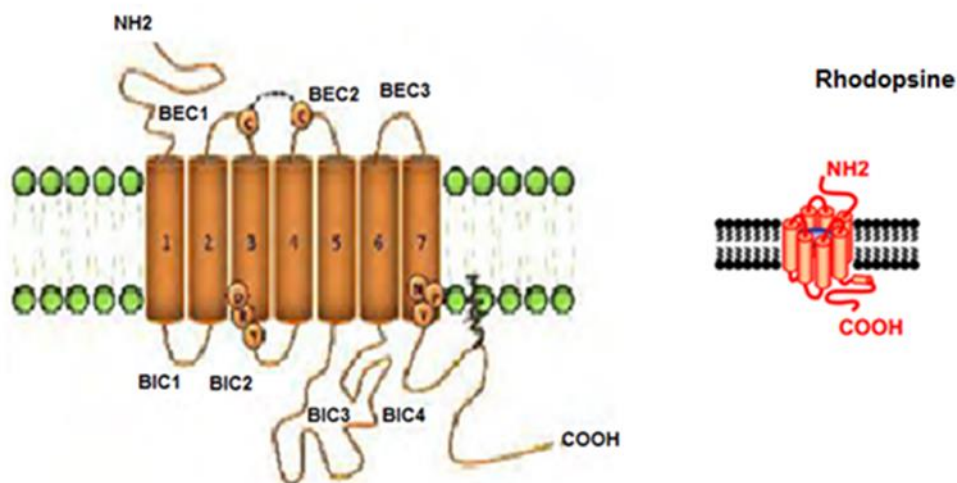
## Revue bibliographique

La famille de la rhodopsine est le premier récepteur à sept domaines transmembranaires (figure 8) ayant été cristallisé grâce aux travaux de Palczewski sur la rhodopsine bovine (Hibert et al., 1991 ; Kristiansen, 2004 ; Arrault ,2018).

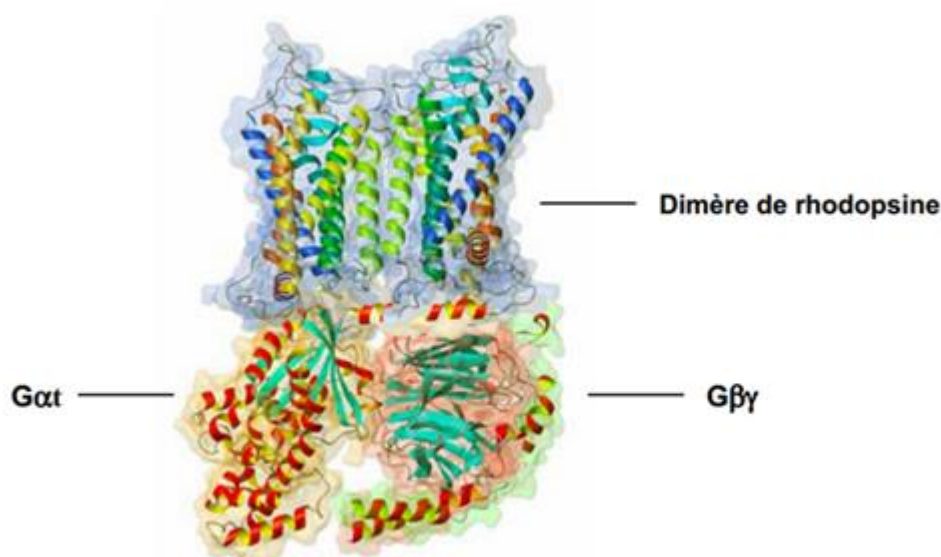
Structurellement, les RCPG de cette famille présentent une extrémité N-terminale relativement courte. Le site de liaison du ligand correspond à une poche hydrophobe située au milieu des domaines transmembranaires (TM3, TM5, TM6 et TM7). Rapporté par les travaux de Gershengorn et Osman ,2001 ; Floquet ,2016.

La famille de la Rhodopsine ont presque tous comme caractéristique une séquence NSxxNPxxY dans le TM7 et dont le motif E/DRY (aspartyl-arginyl-tyrosyl) à l'extrémité cytoplasmique du domaine transmembranaire 3 (TM3). Ce motif DRY joue un rôle dans la stabilité du récepteur et dans le couplage du récepteur aux protéines G hétérotrimériques (figure 8). Un pont disulfure (S-S) entre deux résidus cystéyl relie les boucles intracellulaires (ICL1 et ICL2) qui forment un pont disulfure qui semble important pour la conformation du récepteur (Hibert et al., 1991 ; Kristiansen, 2017).

La présence d'un acide aminé aspartate très conservé dans le TM2 et quatre résidus hydrophobes des TM6 et TM7 (proline, phénylalanine, asparagine) qui seraient importants pour l'activation des récepteurs (figure 9). Une cystéine palmitoylée est retrouvée dans la partie C-terminale permettant la formation d'une quatrième boucle intracellulaire (Farrens,2004 ; Floquet ,2016).



**Figure 8** : Structure de rhodopsine like.



**Figure 9.** Modèle d'interaction théorique entre un dimère de rhodopsine et la transducine (Gt) (Liang et al., 2003 ; Maurel,2017).

### 1.2.3. La famille des récepteurs d'adhésion :

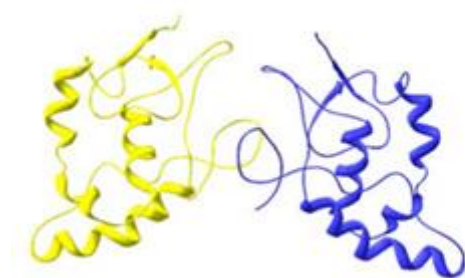
Ces récepteurs présentent des répétitions de domaines impliqués dans l'adhésion cellulaire à leur extrémité N-terminale, comme les domaines du type EGF ou muscin ou encore des domaines riches en cystéines (Simonds,1993 ; Martinez,2020). La taille du récepteur est alors fonction du nombre de répétitions des domaines. Ces RCPG possèdent une très longue région terminale extracellulaire pouvant varier de 200 à 2800 acides aminés et contenant des domaines aux fonctions multiples dont la plupart ont des propriétés adhésives. Ces domaines sont généralement uniques à cette famille de RCPG de par leurs similarités avec d'autres protéines de membranes telles les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les cadhérines et les intégrines (amamoto et Miyano ,2000 ; Weiss ,2020).

### 1.2.4. La famille des récepteurs Frizzled/TAS2 :

Les récepteurs Frizzled (Frz) sont au nombre de dix et participent au complexe oligomériques liant les facteurs de croissance de type Wnt une glycoprotéine, ou récepteurs Frizzled (FRZ1-10) (Boutros et al. 2000 ; Veeman et al. 2003 ; Liuw 2021). Ils sont essentiellement impliqués dans la régulation de la polarité cellulaire et tissulaire, le développement embryonnaire, la formation des synapses, la régulation de la prolifération, et une multitude d'autres processus rencontrés au cours du développement et après. La signalisation Wnt est aussi impliquée dans de nombreuses maladies humaines telles que le cancer, l'ostéoporose et les maladies cardiovasculaires. (Maurel,2017).

Les récepteurs Frz contiennent 7 segments hydrophobes qui caractérisent ces récepteurs transmembranaires et présentent des boucles intracellulaires sont parmi les plus courtes des RCPG. La partie N-terminale extracellulaire de 200 à 300 acides aminés comporte un domaine riche en cystéines ou Cystein riche Domain (CRD) suivi d'une région hydrophile (figure 10) qui semblent impliquées dans l'oligomérisation de ces récepteurs et la liaison à Wnt) (Siderovski., et Gonczy,2004 ; Lefkouritz 2018). Ce domaine CRD comporte 10 résidus cystéine conservés, chacun d'entre eux formant des ponts disulfures, peut lier les lipoglycoprotéines de la famille Wnt (Boutros et al. 2000 ; Veeman et al. 2003 ; Lefkouritz 2018).

Les analyses phylogéniques ont montré que les récepteurs de type 2 du goût (TAS2) font partie de la même famille que les récepteurs Frizzled (Ferguson,2002 ; Maurel,2017). Les récepteurs TAS2 (Taste receptor de type 2), qui comptent au moins 30 membres dans le génome humain, sont exprimés dans l'épithélium de la langue et le palais et sont probablement impliqués dans la détection du goût amer (Bouvier, 2005 ; Liuw 2021).

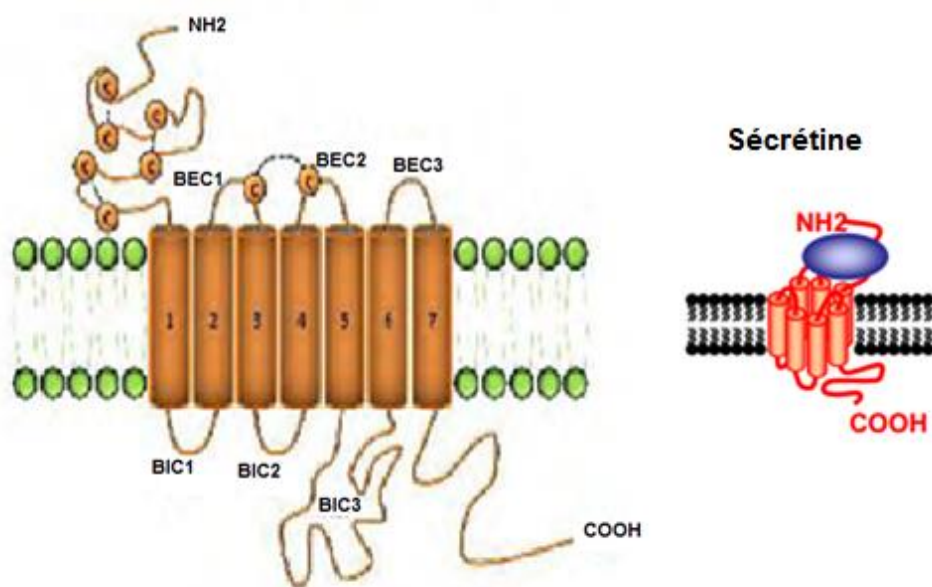


**Figure 10** : Evidences de l'existence de dimères de RCPG.

Structure cristallographique du DEC du récepteur Frizzled, lui aussi dimérique (code pdb : 1IJY). (Liang et al., 2003 ; Maurel,2017).

### **1.2.5.La famille des récepteurs à la sécrétine (secretin like) :**

Cette famille comprend les récepteurs à la sécrétine, mais également les récepteurs à la calcitonine (Duzic, 1999 ; Moreau, 2014), les récepteurs CRLR (Calcitonin receptor-like receptor) et les récepteurs au glucagon. Ils se caractérisent par un long domaine N terminal (figure 11), qui intervient avec les boucles extracellulaires pour la fixation d'un ligand. Ils possèdent tous une extrémité N-terminale de taille importante (60 à 80 acides aminés), riche en résidus cystéine, permettant la liaison du ligand au récepteur. La plupart des ligands sont de poids moléculaires élevés, les hormones peptidiques (van Galen et Simonds,1993 ; Pontier 2016).

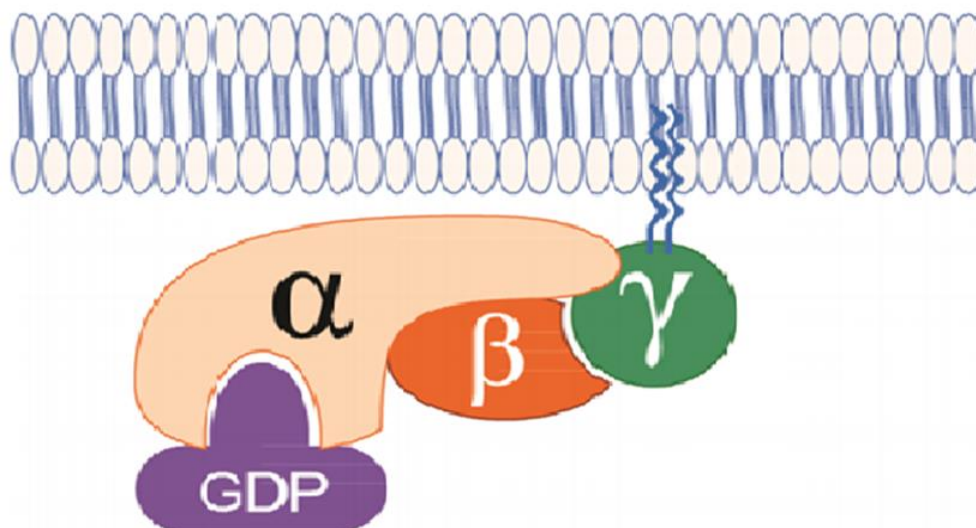


**Figure 11** : Structure de secretin like .

## 2. Description des protéines G :

### 2-1 structure des protéines G

Les protéines G hétérotrimériques permettent la transduction de signaux transmembranaires (Dalle et al., 2001 ; Wang 2021). Elles interagissent exclusivement avec une classe de récepteurs à sept domaines transmembranaires, qui, pour cela, sont nommés G-Protein Coupled Receptors (GPCRs). Les protéines G trimériques interagissent avec les RCPG par l'intermédiaire de quelques résidus amino-acyls localisés principalement sur les boucles intracellulaires 2 et 3, et sur la partie proximale de l'extrémité C-terminale (Neer, 1995 ; Edelstein 2019). La protéine-G trimérique est liée à la membrane par des queues lipidiques : myristoyl ou palmitoyl (acides gras) pour le  $G\alpha$  et farnésyl ou géranylgeranyl (isoprénoïdes) pour le  $G\gamma$  (figure12). Elles sont composées de trois sous-unités,  $G\alpha$  (45 kDa),  $G\beta$  (35 kDa) et  $G\gamma$  (35 kDa) formant un hétérotrimère ancré à la membrane par la sous-unité  $G\gamma$  (figure 12). Selon les travaux de Gales et al., 2005 ; Wang 2021.



**Figure 12** : Représentation schématique d'une protéine G hétérotrimérique ( $G\alpha\beta\gamma$ ) à la membrane plasmique.

La sous-unité  $G\alpha$  est une protéine composée de deux domaines bien distincts : un domaine GTPase impliqué dans l'échange GDP/GTP et dans l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine riche en hélices  $\alpha$  susceptible d'interagir avec les RCPG et la sous-unité  $G\beta$  (Figure 13) rapporté de Rebois et Hebert, 2003 ; Wang 2021.

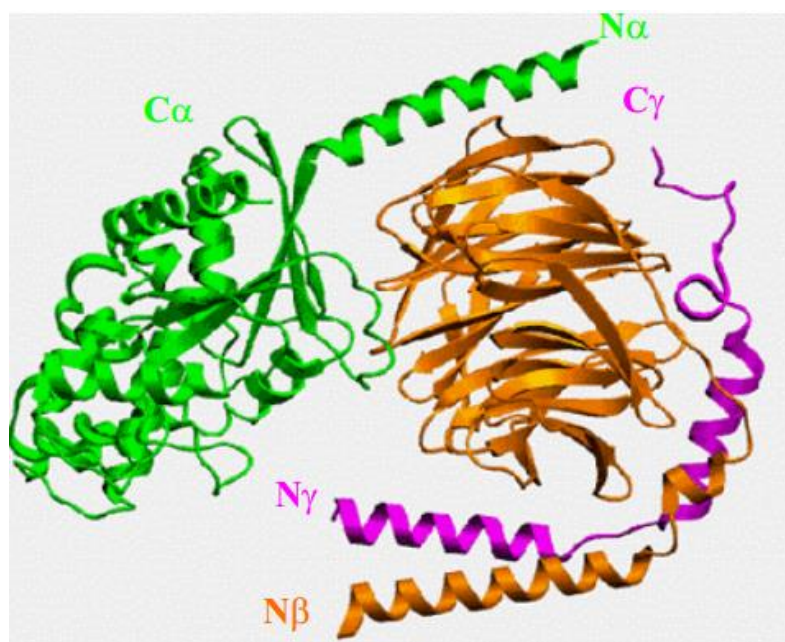
Les domaines N- et C- terminaux de  $G\alpha$ , tous deux proches de la membrane plasmique, pourraient jouer un rôle clé dans les processus d'activation et dans la spécificité des interactions protéine – protéine (récepteurs, effecteurs...). Selon les travaux de Maurel, 2017.

La sous-unité  $\beta$  est caractérisée par sept feuillet  $\beta$  antiparallèles, appelés WD-repeats, car les séquences d'environ 35 acides aminés du « repeat » se terminent souvent par tryptophane (W) et aspartate (D). L'ensemble des repeats-WD forme une hélice, structure impliquée dans les interactions protéine-protéine. (Boutros et al 2000 ; Klein 2020)

La sous-unité  $\gamma$  est une petite chaîne de 72 acides aminés dont 54 constituent le motif GGL (G protein Gamma subunit-like motifs) selon les travaux de Veeman et al. 2003 ; Bockert 2020.

Le complexe  $G\beta\gamma$  Lorsque la sous-unité  $\alpha$  se dissocie du complexe hétérotrimérique, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  restent associées entre elles à la membrane. La sous-unité  $\beta/\gamma$  était considérée comme une simple protéine servant d'échafaudage sans rôle particulier. Après de plus amples investigations, ce complexe a été corrélé à l'activation des « G-protein inwardly rectifying K<sup>+</sup>channel » (GIRKs) (Lüscher et Slesinger, 2010 ; Klein 2020). Le complexe  $\beta/\gamma$  peut également activer la MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») ERK1/2 (« extracellular signal-regulated kinases

») lorsqu'il est associé à la sous-unité  $G_i$ , qui, comme cité précédemment, est associée majoritairement à sa signalisation. (Lanier, 2004 ; Bockert 2020). Elle interagit également avec des effecteurs, tels que les canaux  $K^+$  du cœur, la phospholipase-A2 et certaines isoformes de phospholipase-C $\beta$ . Les sous-unités  $G\beta$  présentent une très haute affinité pour les sous-unités  $G\gamma$ . De plus, l'interaction entre ces deux protéines est stabilisée par une interaction entre leurs domaines N-terminaux de type super hélicoïdale (Garritsen et al., 1993). Le complexe  $\beta\gamma$  subit des modifications post traductionnelles par ajout de lipides qui permettent l'ancrage du complexe à la membrane plasmique (Maurel, 2017).



**Figure 13 :** Structure tridimensionnelle du complexe hétérotrimérique  $G\alpha\text{GDP}-G\beta-G\gamma 1$  (PDB code 1GOT). La sous unité  $\alpha$  est représentée en vert et les sous unités  $\beta$  et  $\gamma$  en orange et magenta respectivement. (Musnier et al., Bockert 2020).

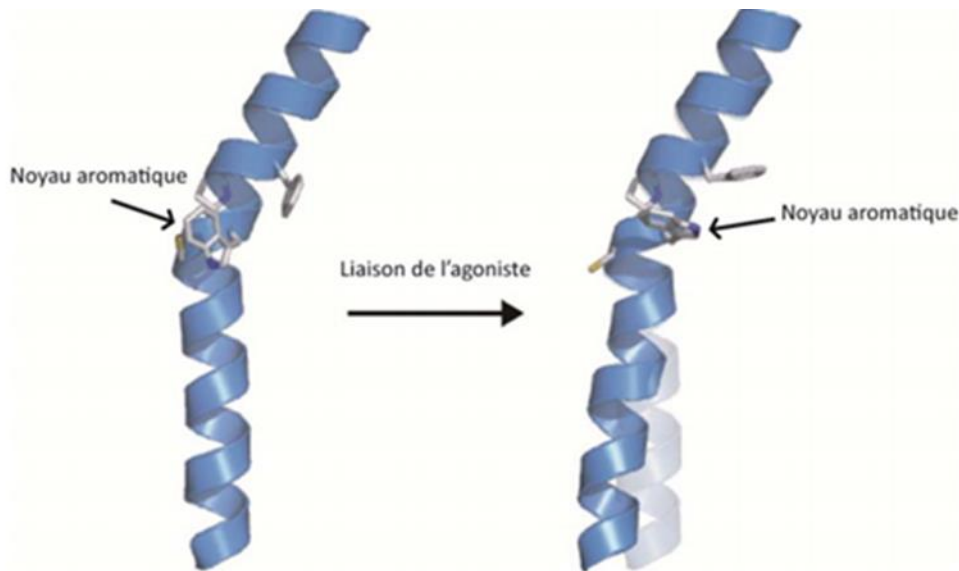
### 2.2. Modèle d'activation des GPCR :

Le GPCR au repos est activé après interaction avec son agoniste au niveau du domaine extracellulaire ou du domaine transmembranaire (TM). Cette fixation entraîne des changements moléculaires à l'intérieur de ses TM. Des études sur le récepteur Rhodopsine, et sur le  $\beta 2\text{AR}$ , ont démontré que deux changements majeurs lors de son activation : un changement dans la position d'un noyau aromatique à l'intérieur du TM6 (figure 14 ,15), selon les travaux de Kisselev et al, 1995 ; Marts 2015.

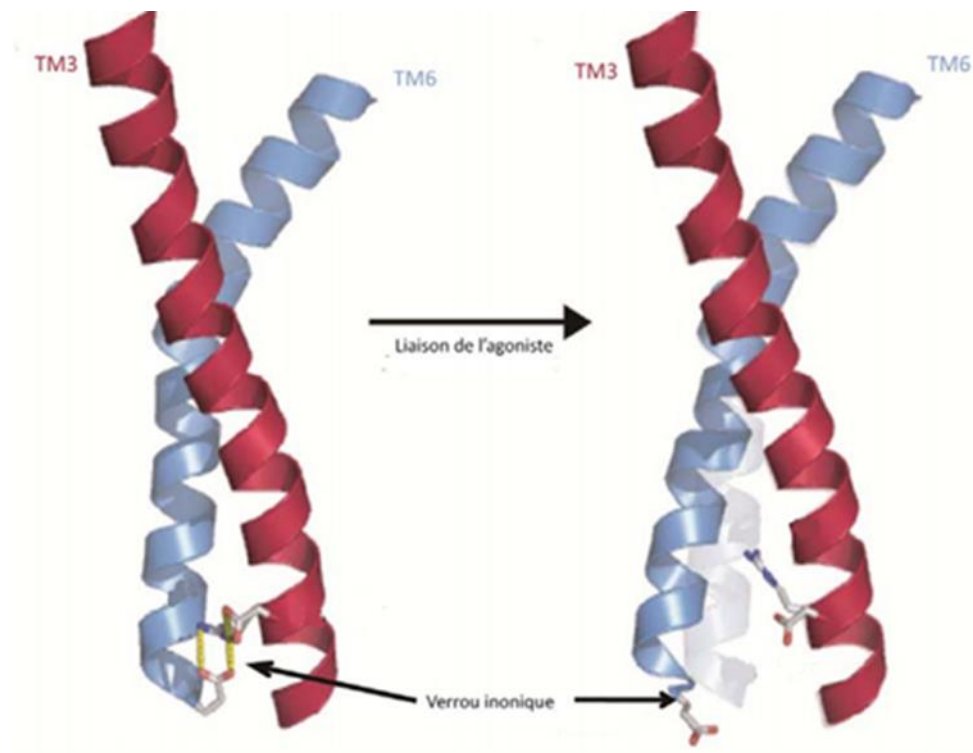
Le mécanisme majeur est l'écartement du TM6 lorsque le ligand se fixe et active le récepteur. Une fois le TM6 écarté, cela forme une poche dans laquelle la protéine G va pouvoir venir s'engouffrer et interagir avec les acides aminés des TM 3, 5 et 7

(Ibrahim et al, 2019). Ces changements intramoléculaires permettent le déplacement de la partie intracellulaire du TM6 et l'ouverture d'une cavité. C'est dans cette cavité que l'extrémité C-terminale de la transducin (protéine G liant la Rhodopsin) s'introduit pour être activée (Lohse ,2014). Le récepteur agit ainsi comme un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF pour guanine exchange factor) et produit l'échange d'un GDP pour un GTP sur la sous-unité  $\alpha$  (Wess ,2016).

Cette activation de la sous unité  $\alpha$  permet le relâchement du dimère  $G\beta\gamma$ , les deux parties de la protéine G se retrouvant libre capables de moduler directement une multitude d'effecteurs (Kobilka, 2020).



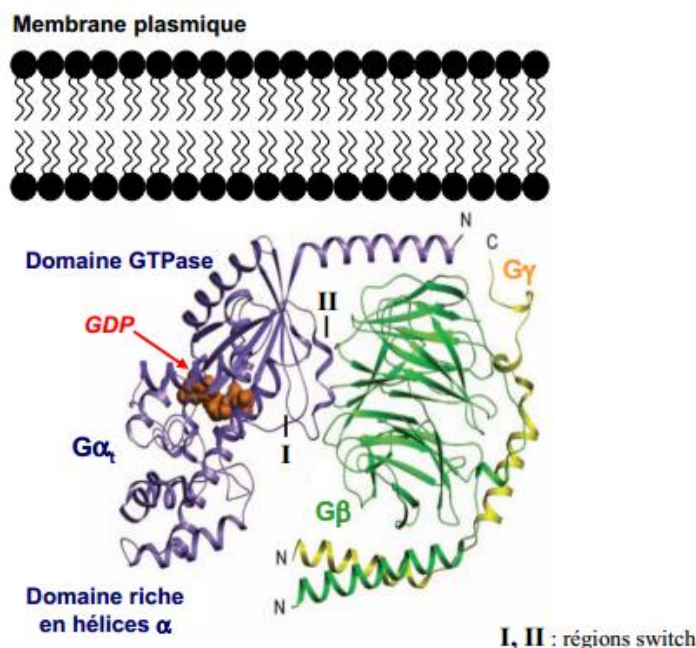
**Figure 14** : la liaison d'un agoniste sur un récepteur de la famille R provoque la rotation d'un noyau aromatique à l'intérieur du TM6 un changement dans l'angle de l'hélice.



**Figure 15** : l'activation du récepteur par un agoniste brise le lien ionique entre le TM3 et le TM6 qui maintient récepteur inactif.

### 2.3. Le cycle d'activation de $G\alpha$ :

Ces protéines G sont constituées de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) reliées au feuillet interne de la membrane plasmique par des ancres lipidiques sur les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  (figure 16)



**Figure 16** : Structure d'une protéine G hétérotrimérique (Hamm et al., 2003 ; Salahi 2014).

La sous unité  $G\alpha$  est formée de deux domaines : un domaine analogue aux petites protéines G de type Ras qui lie le nucléotide et un domaine  $\alpha$ -hélicoïdal. La sous-unité  $G\alpha$  interagit avec  $G\beta$  au niveau de deux interfaces : au niveau de l'hélice N-terminale et au niveau de deux régions, appelées Switch I et II, qui ferment le site de fixation du GDP. Enfin, il existe une modification lipidique au niveau de l'extrémité N-terminale de la sous-unité  $G\alpha$  sur des résidus non présents dans la structure, et au niveau du domaine C-terminal de la sous-unité  $G\gamma$ . Ces modifications lipidiques permettent l'ancrage des différentes sous-unités à la membrane plasmique (Maurel, 2017).

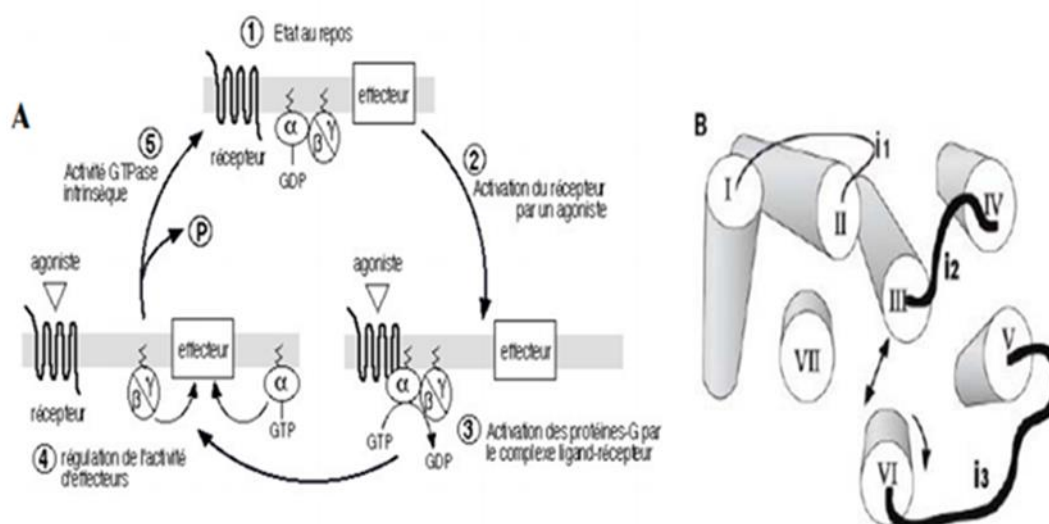
La sous-unité  $G\alpha$  est composée de deux domaines bien distincts : un domaine GTPase impliqué dans l'échange GDP/GTP et dans l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine hélice  $\alpha$  susceptible d'interagir avec les RCPG et la sous-unité  $G\beta$ . C'est cette sous-unité  $\alpha$  qui permet en grande partie la transduction du signal. (Palczewski et al., 2000 ; Arrault 2018),

A l'état basal,  $G\alpha$  est liée à  $G\beta\gamma$  et présente sous cette forme une affinité élevée pour le GDP (guanosine diphosphate). Dans cette conformation inactive, l'interaction entre  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  s'effectue au niveau d'une poche hydrophobe dans le domaine GTPasique. La sous-unité  $G\beta$  possède une structure en feuillet  $\beta$  contenant sept répétitions WD-40 et interagit avec la sous-unité  $\gamma$  grâce à un faisceau d'hélices (Gether, 2000 ; Maurel, 2017), figure 17.

Ce dimère  $G\beta\gamma$  lie une poche hydrophobe présente sur la sous-unité  $G\alpha$  non activée (liée au GDP).

Lorsque le récepteur est activé à l'issue de sa liaison au ligand, il induit un changement structural de  $G\alpha$  en interagissant avec sa poche hydrophobe et déplace sa liaison au dimère  $G\beta\gamma$  (Lambright et al., 1996 ; Arrault 2018). Cet événement entraîne une diminution de l'affinité de la sous unité  $G\alpha$  pour le GDP qu'elle libère, agissant à titre de GEF (guanidine nucleotide exchange factor), favorisant l'échange de GDP pour le GTP ( figure 17,18) selon les travaux de (Reed and Bourne ,1992 ; Weiss 2020) Cette activation mène à la dissociation de la protéine G hétérotrimérique en une sous-unité  $G\alpha$  active liée au GTP d'une part, et un dimère  $G\beta\gamma$  d'une autre ,où tous deux sont alors libres d'interagir et d'activer leurs effecteurs cibles (enzymes ou canaux ioniques) selon les travaux de Neer, 1995 ; Licuw 2021.

Le signal transmis par les protéines G est interrompu lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, permettant ainsi la reconstitution de l'hétérotrimère  $G\alpha\beta\gamma$ . La sous unité  $\alpha$ (GTP) reste active tant que son activité GTPase (activée par une protéine RGS) n'a pas hydrolysé le GTP en GDP. La sous unité  $\alpha$  possède une activité GTPasique. Lorsqu'elle hydrolyse son GTP en GDP, elle se réassocie à un complexe  $\beta\gamma$  pour réformer un trimère inactif, prête à repartir pour un tour (Garcia-Marcos, Ghosh and Farquhar, 2015). Ce processus peut aussi être favorisé par les membres de la famille RGS (regulator of G protein signaling), qui agissent à titre de GAPs (GTPase activating protein), des protéines qui lient et stimulent l'activité GTPase des protéines G. (Ghosh et Farquhar, 2015).

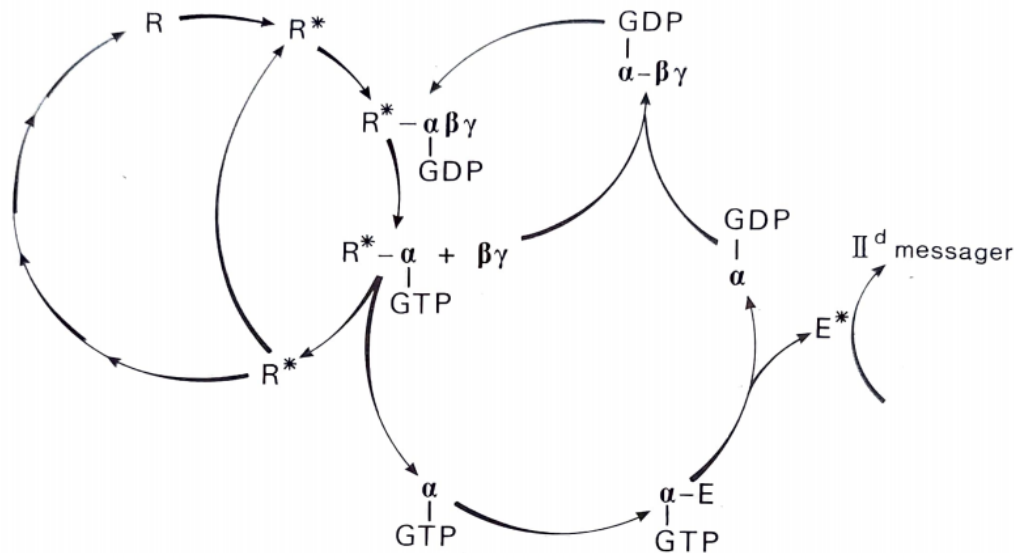


**Figure 17** : Mécanisme de la transduction du signal et changements conformationnels relatifs du domaine transmembranaire (Mobarec & Filizola ,2018).

A. Un GPCR au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine G hétérotrimérique : les sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  intracellulaires (3) vont aller réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques (4). Le

déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité  $G\alpha$  entraîne la réassociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  (5) et le retour à l'état initial (1).

B. L'activation du récepteur par la fixation de son agoniste entraîne des changements conformationnels. On observe la rotation dans le sens des aiguilles d'une montre de TM6 et un éloignement des TMs 3 et 6.



**Figure 18** : Mécanisme d'activation des protéines G. (Pelé, 2010)

**(1)**: En absence du neuromédiateur, les récepteurs (R) et la protéine G ( $\alpha\beta\gamma$ -GDP) n'ont pas d'interactions privilégiées. La chaîne  $\alpha$  de la protéine G est occupée par du GDP (guanosine diphosphate) et se trouve associée aux chaînes  $\beta\gamma$ .

**(2)**: Lorsque le récepteur est occupé par le neuromédiateur, il change de conformation ( $R^*$ ), interagit avec la protéine G, et il se produit une ouverture du site nucléotidique. Celui-ci échange alors son GDP avec du GTP (guanosine triphosphate). Ceci entraîne une dissociation entre  $\alpha$ -GTP et  $\beta\gamma$ .

**(3)** :  $\alpha$ -GTP stimule alors soit directement les canaux ioniques soit comme c'est figuré ici, une enzyme. L'hydrolyse du GTP en GDP permet au système de retourner soit à l'état (1), soit à l'état (2) selon que le neuromédiateur est encore lié ou non au site récepteur (Chabre et al, 1983; Morin 2015).

Le cycle est constitué de cinq étapes : -La fixation d'un agoniste sur les RCPG active les protéines G. Le GTP est remplacé par du GDP au niveau de la sous-unité  $\alpha$  et les protéines G se dissocient. La sous-unité  $\alpha$  et le dimère  $\beta\gamma$  activent certains effecteurs qui agissent sur la réponse cellulaire. L'activité GTPase de la sous-unité  $\alpha$  permet de rétablir l'état de repos initial des RCPG. (Figure 18). Selon les travaux de Tuteja, 2019.

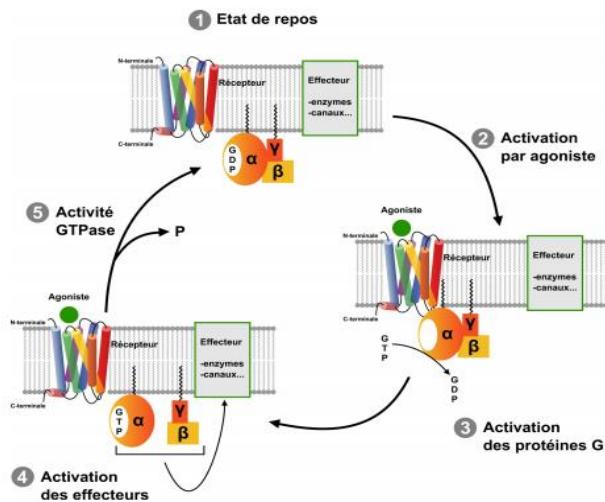


Figure 19 : Cycle d'activation des RCPG (Tuteja, 2019).

#### 2.4. Diversité des protéines G hétérotrimériques :

Il existe au moins 20 différentes sous-unités  $G\alpha$ , séparées en différentes familles : les protéines  $G_{\alpha s}$ , les protéines  $G_{\alpha i/o}$ , les protéines  $G_{\alpha q}$  et les protéines  $G_{\alpha 12/13}$ , toutes couplées à différents profils d'effecteurs à l'intérieur de la cellule (figure 20,21).

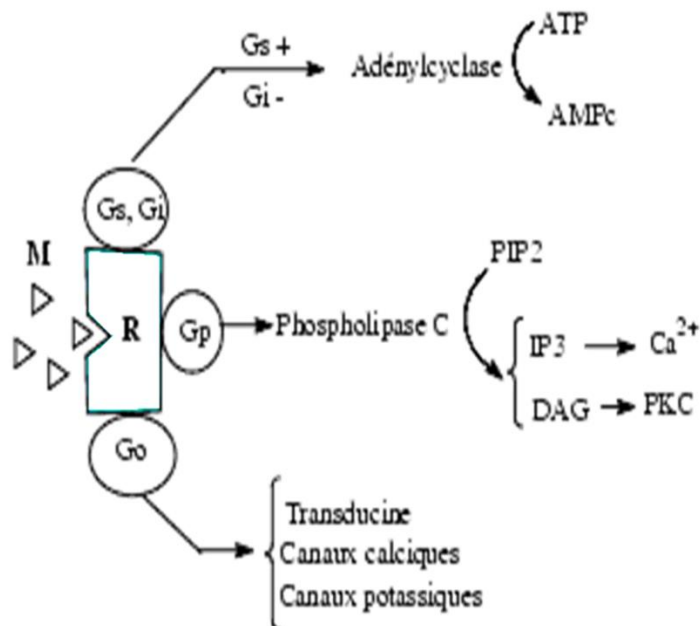
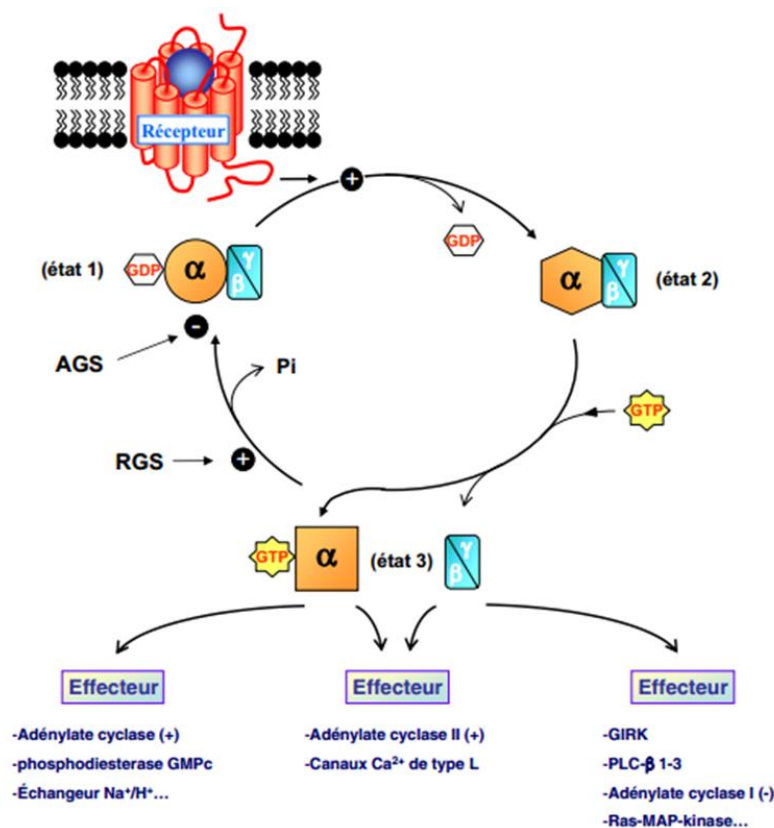


Figure 20 : Diversité des protéines G

Go (o pour other = autre) des protéines Go : Gp, Gk, G<sub>Ca</sub>, G<sub>t</sub>

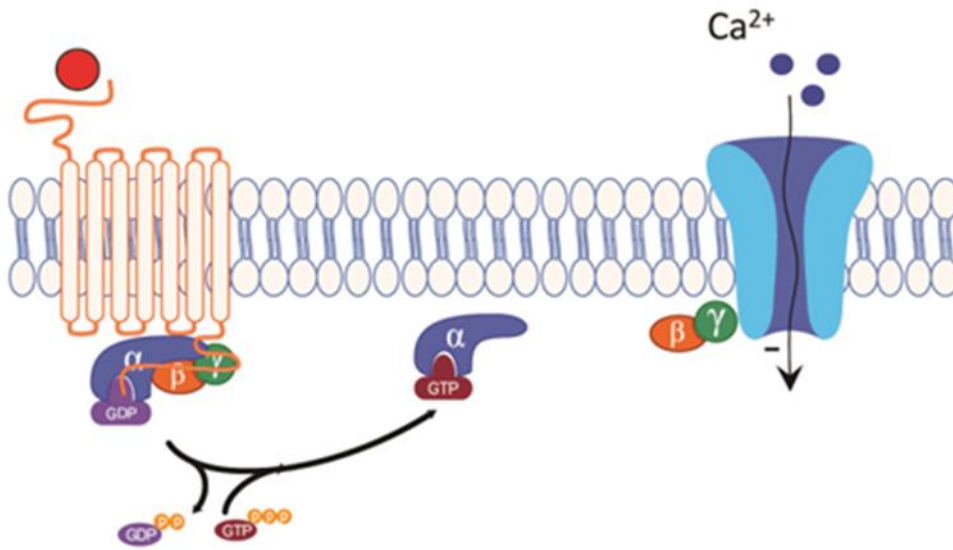
1. Gp qui modulent l'activité de la phospholipase C.
2. Gk qui modulent l'ouverture des canaux potassiques.
3. G<sub>Ca</sub> qui modulent l'ouverture des canaux Ca<sup>2+</sup>.
4. G<sub>t</sub> transducine, assurant le couplage entre la rhodopsine et la phosphodiésterase dépendante de la GMPc des CC bâtonnets et des cônes rétiniens



**Figure 21** : Diversité des protéines G hétérotrimériques et cycle d'activation.

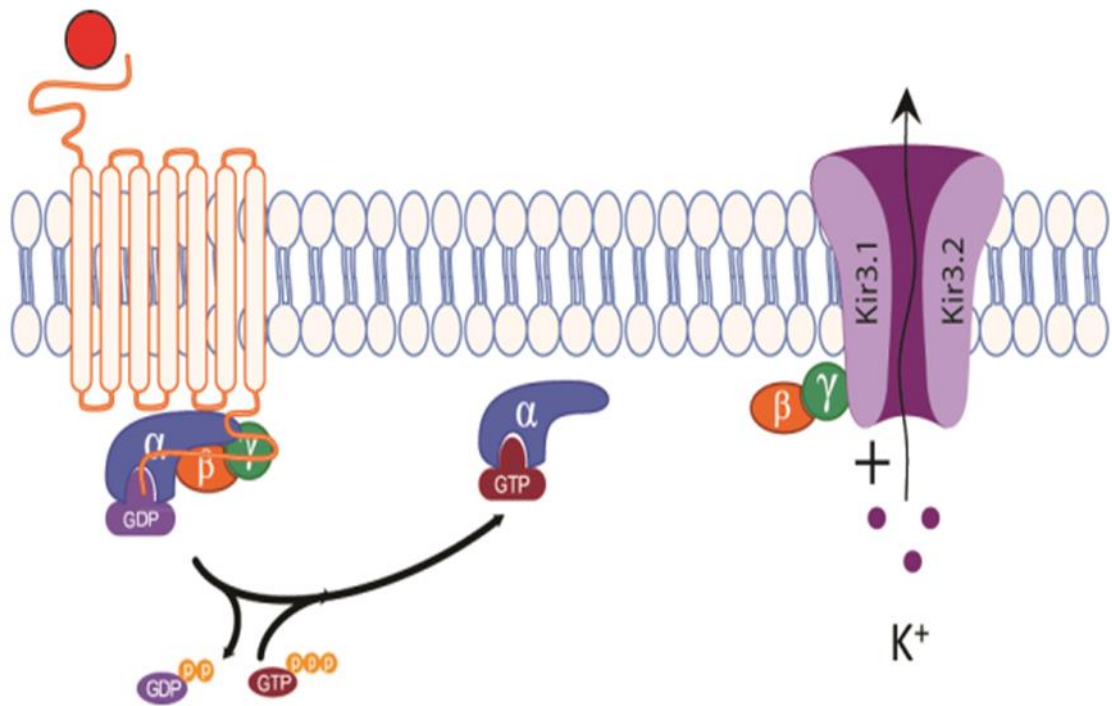
Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP (état 1) un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G (état 2) et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités Gα et Gβγ (état 3). Néanmoins, de nouvelles données obtenues par des approches de transfert d'énergie ont relancé le débat sur le degré d'association de ces protéines au cours des processus d'activation. (Maurel,2017).

Les protéines Gαs seraient responsables de l'augmentation de l'activité de l'AC, les protéines Gαi seraient responsables de l'inhibition de l'AC, la modulation des canaux calciques (figure 22) et la modulation et potassiques à rectification entrante (aussi appelé Kir3 ou GIRK pour G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels) (figure 23) rapporté par les travaux de McIntire et al., 2001 ; Malki 2016, les protéines Gαq seraient responsables de l'activation de la phospholipase β (PLCβ) qui mène à l'activation de protéines kinases C et à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium intracellulaires de calcium (Taylor et al., 1994 ; Tuteja2019).



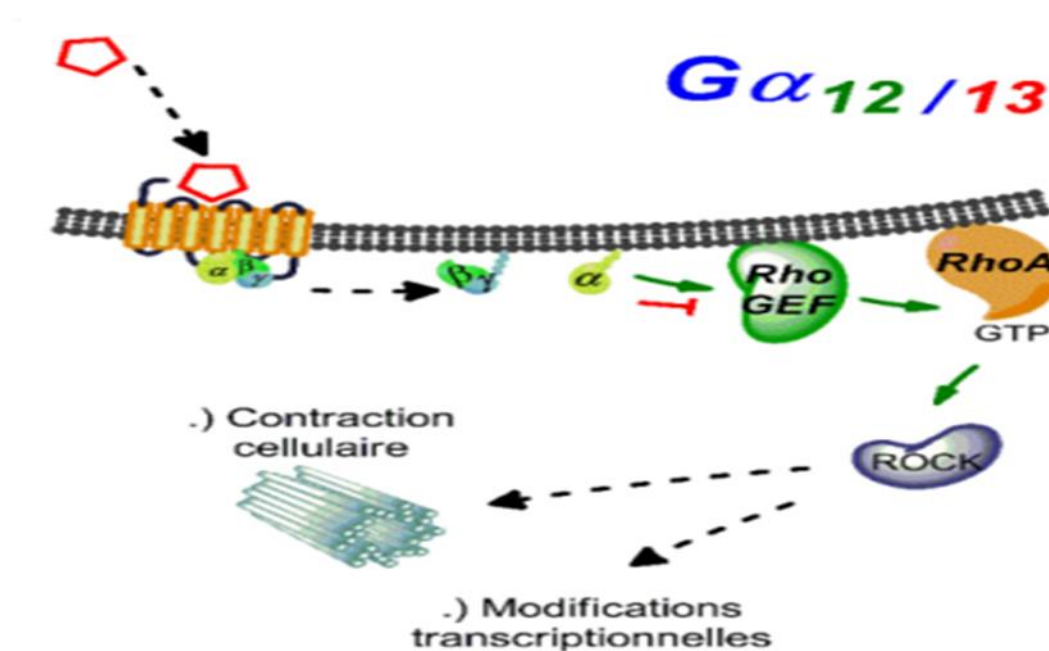
**Figure 22** : régulation d'un Cav2 par les G $\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG.

L'activité des canaux calciques dépendant du voltage peut être régulée par l'activité de certains RCPG.



**Figure 23** : régulation d'un Kir3 par les G $\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG.

Les protéines  $G\alpha_{12/13}$  seraient responsables de l'activation d'une protéine Rho GEF (guanine nucleotide exchange factor), expliquée dans la figure 24. Les protéines  $G\alpha_{12}$  et  $G\alpha_{13}$  sont impliquées dans l'activation des GEF. Ceux-ci permettent le switch moléculaire de la protéine RhoA par l'échange de son GDP en GTP. La RhoA est une GTPase impliquée, notamment, dans les processus d'adhésion et de migration cellulaire via la régulation de la contractilité de l'actomyosine (Milligan et Kostenis, 2006 ; Malki 2016). Le complexe  $\beta\gamma$  interagit également avec des effecteurs, tels que les canaux  $K^+$  du cœur, la phospholipase-A2 et certaines isoformes de phospholipase- $C\beta$ . (Yasuda et al., 1996 ; Malki 2016).

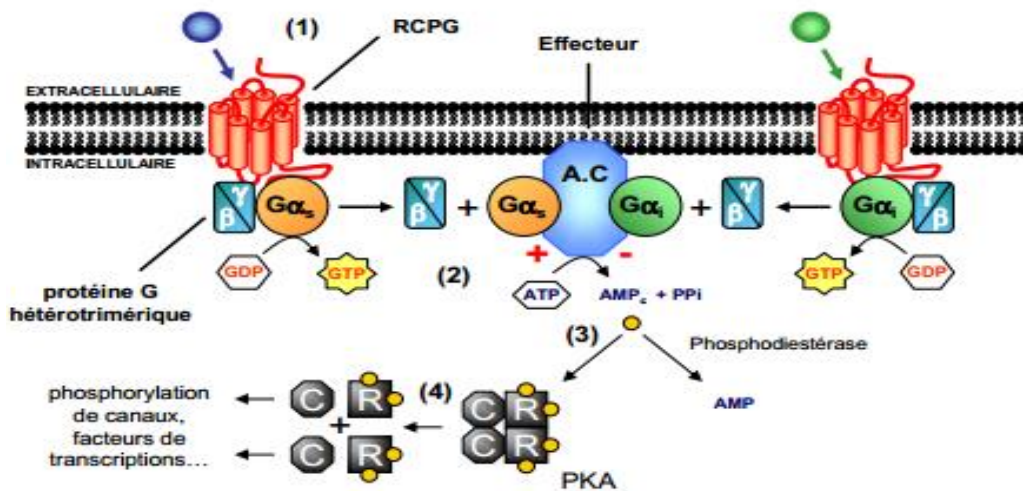


**Figure 24** : Schématisation des voies de signalisation des protéines  $G\alpha$ . Schématisation de la signalisation induite par les différentes sous-unités  $G\alpha$ , suivant l'activation d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires (Garritsen et al., 1993 ; Flouquet ,2016).

## 2.5. Effecteurs de la Protéine G :

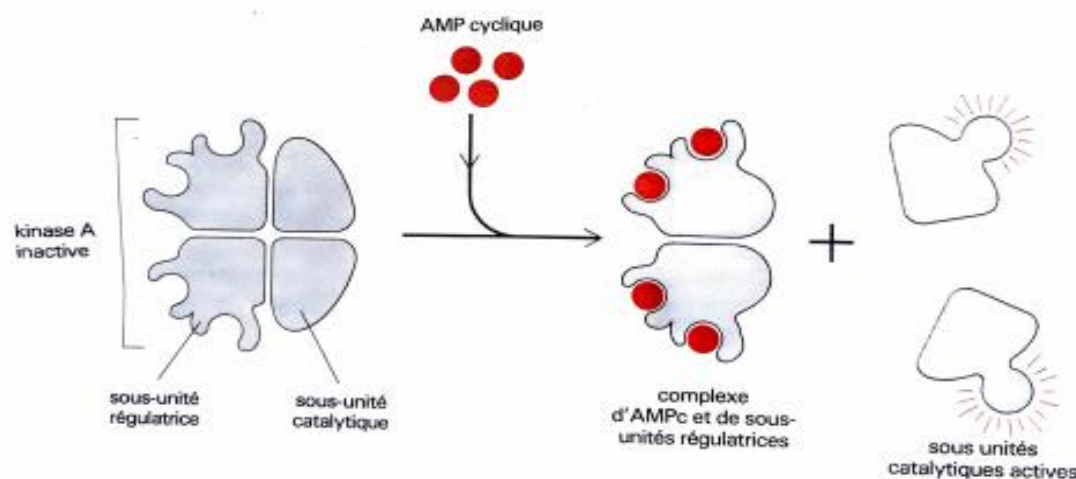
### 2.5.1. L'adénylate-cyclase (AC) :

L'adénylate-cyclase est une enzyme, stimuable par la forskoline, qui synthétise de l'AMP cyclique à partir de l'ATP. La réaction nécessite du magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et provoque la libération de pyrophosphate (Figure 25). L'AMPc devient à son tour activateur de la protéine kinase A. (Figure 26). Selon les travaux de Hanoune et Defer, 2001 ; Weiss 2020.



**Figure 25 :** RCPG et seconds-messagers.

(1) activation du récepteur par un signal externe. (2) activation des protéines G $\alpha$ s ou G $\alpha$ i. (3) activation via G $\alpha$ s ou inhibition via G $\alpha$ i de la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (A.C). (4) activation de la protéine kinase A (PKA) par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) suite à la dissociation de ses sous-unités régulatrices (R) et catalytiques (C). Rapporté par les travaux de Tesmer et al, 1997 ; Wang 2021).



**Figure 26 :** schéma de l'activation de la protéine kinase AMPcyclique –dépendante Kinase A.

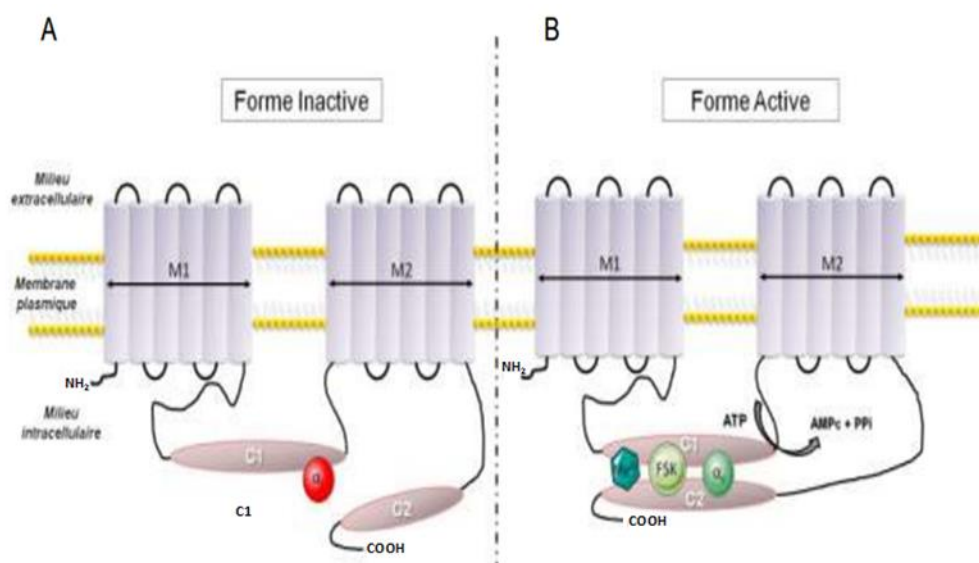
La liaison de l'AMP cyclique aux sous-unités régulatrices induit un changement de conformation responsable de la dissociation de ces sous-unités du complexe, qui vont alors être activées. Chaque sous-unité régulatrice a deux sites de liaison de l'AMP cyclique et la libération des sous-unités catalytiques est un mécanisme coopératif qui

nécessite la liaison de plus de deux molécules d'AMP cyclique au tétramère. Ceci accentue beaucoup la réponse de la kinase aux modifications de la concentration en AMP cyclique. (Hu et al., 2002 ; Pelletier 2019).

L'adénylate cyclase est activée spécifiquement par la sous-unité Gs liée au GTP alors qu'elle est inhibée spécifiquement par la protéine Gi-GTP. Il existe six grandes classes d'AC, mais seulement la classe III est présente chez les mammifères. La classe III est composée de neuf gènes codant pour des sous-classes d'AC transmembranaires et un gène codant pour une sous-classe d'AC soluble. (Tesmer et al., 1997 ; Quinon, 2017).

L'AC est ancrée dans la membrane cellulaire par douze domaines transmembranaires répartis en 2 régions M1 et M2 (Figure 27). Le cœur catalytique de l'AC est formé par le rapprochement des domaines cytoplasmiques C1 et C2. L'ATP se fixe au niveau des sites de liaisons localisés sur le domaine C1 (domaine catalytique) où il sera hydrolysé en AMPc + pyrophosphate (PPi). Le domaine C2 est le domaine régulateur où se trouve le site de liaison des sous-unité  $\alpha$  de la protéine G ainsi que des sites de liaison de la forskoline (FSK) ou encore du magnésium. (Felouzis, 2014)

Les niveaux d'AMPc sont aussi régulés par l'action des enzymes phosphodiésterases (PDE) qui en assure la dégradation. Chez les mammifères, ce sont les familles PDE1, 2, 3, 4, 7 et 8 qui hydrolyse l'AMPc en AMP (Afshar et al., 2004 ; Boussif 2018).



**Figure 27** : Structure de l'Adénylate Cyclase.

### 2.5.2. La phosphodiésterase (PDE) :

La phosphodiésterase est une enzyme qui hydrolyse le GMPc en 5' -GMP. Ce type d'enzyme est notamment présent dans la rétine (Heredia et al., 2003 ; Martinez, 2021). Une photo-excitation de la rhodopsine, entraîne l'activation de la sous-unité G t (G

transducine). Cette sous-unité Gt va ensuite activer à son tour la phosphodiesterase présente dans les cellules photo-réceptrices (Shieh et al., 2001 ; Felouzis, 2014). Le GMPc a pour fonction de maintenir ouverts les canaux sodiques à l'origine de la dépolarisation du nerf optique (Xiang et al., 2004 ; Arrault 2018). L'hydrolyse du GMPc par la PDE entraîne la fermeture des canaux et une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Il existe plusieurs types de phosphodiesterases (GMPc ou AMPc phosphodiesterases). Certaines d'entre elles peuvent être activées par la sous-unité Gi. (Demo et al., 1999 ; Arrault 2018).

### 2.5.3 La phospholipase C (PLC) :

L'activation de la phospholipase C par les sous-unités de la classe  $G\alpha_q$  aboutit à la synthèse du diacylglycérol (DAG) qui reste au contact de la membrane lipidique et d'inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) qui diffusent dans le cytoplasme à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) membranaire (figure 28), Muniz-Medina et al., 2009 ; pelé 2017). Des phospho-inositol kinases régénèrent le PIP<sub>2</sub> à partir de l'IP<sub>3</sub>. L'IP<sub>3</sub> diffuse dans le cytoplasme et va agir sur les canaux calciques afin de provoquer la libération de calcium contenu dans les réservoirs du réticulum endoplasmique. (O'Brien et al., 2003 ; pelé 2017).

L'élévation du calcium libre intracytoplasmique entraîne l'activation d'un certain nombre de processus dépendants du calcium et notamment une protéine prenant en charge le calcium, la calmoduline ; (Maeda et al., 2006 ; Xavier 2016). Le complexe calcium-calmoduline peut activer d'autres enzymes telles que l'AMPc phosphodiesterase, la GMPc phosphodiesterase, la phospholipase A<sub>2</sub>. Le DAG est un activateur de la protéine kinase C (PKC) membranaire. La PKC catalyse, en présence obligatoire de calcium, la phosphorylation d'un grand nombre de substrats intervenant dans la différenciation cellulaire, la mitose, l'exocytose, et d'autres processus cellulaires. (Kondru et al, 2008 ; Arrault 2018).

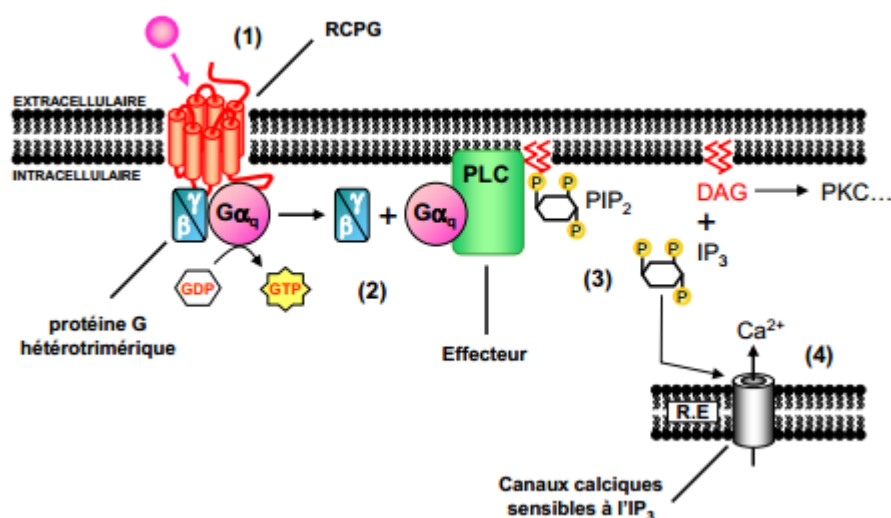


Figure 28 : RCPG et seconds-messagers. A. Voie de signalisation Phospholipase C

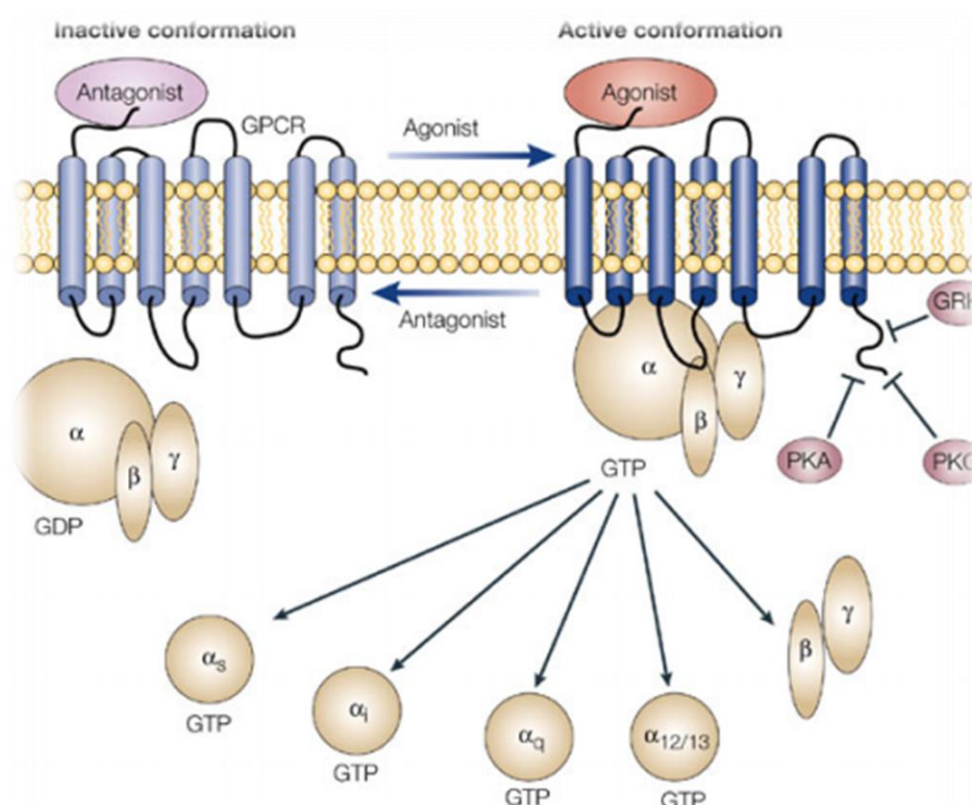
## **Revue bibliographique**

---

(1) activation du récepteur par un signal externe. (2) activation de la protéine Gαq. (3) hydrolyse du phosphatidyl-inositol-4-5-biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). (4) ouverture de canaux calciques du RE via l'IP3 et activation de la PKC via le DAG. Cette dernière va induire l'ouverture de canaux calciques présents au niveau de la membrane plasmique. (Maurel, 2017).

### 3. Différents états conformationnelles d'un récepteur.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une classe importante de récepteurs membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire. Leur changement de configuration est essentiel pour transmettre des signaux à l'intérieur de la cellule en réponse à la liaison d'un ligand extracellulaire (Figure 29) selon les travaux de Heasman et Ridley, 2018, La reconnaissance des molécules messages par les récepteurs membranaires constitue la première étape de la communication cellulaire. Les premiers concepts formalisés étaient basés notamment sur la loi d'action de masse. Cette loi stipule la réversibilité de la liaison ligand – récepteur selon des constantes d'association et de dissociation. (Udod et al., 2019).



**Figure 29 :** activation des différents types de ligands.

Bien que le modèle ternaire étendu permette d'expliquer un certain nombre de situations, ce modèle n'envisage pas tous les cas de figures. Ainsi, un modèle plus complexe, dit modèle ternaire cubique, a été proposé (Weiss et al., 1996 ; Samama, 2016) (Figure 31). Ce modèle conserve les caractéristiques du modèle ternaire étendu mais diffère sur la capacité de couplage des récepteurs inactifs aux protéines G. Ce modèle ternaire cubique fut développé pour intégrer deux nouveaux états composés d'un complexe récepteur inactif protéine G et d'un complexe agoniste-récepteur inactif-protéine G. (Samama et al., 2016).

Les premiers travaux réalisés sur le récepteur  $\beta$ 2-adrénérgique ( $\beta$ 2AR) révèlent l'existence de deux populations différentes de récepteurs : une population de haute affinité et une autre de basse affinité pour le même ligand (Kent et al., 1980 ; Lefkowitz et al., 1976). Le passage de la population de haute affinité vers une basse affinité dépend de la présence de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et de GTP et s'avère associer à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase (un effecteur du  $\beta$ 2AR) en réponse à la stimulation par l'agoniste (Hall, 2014).

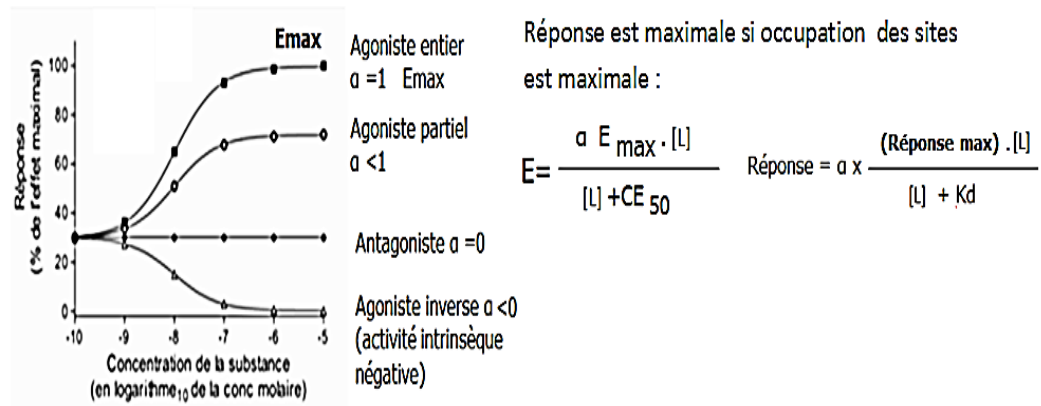
Plusieurs modèles décrivant de manière théorique les mécanismes d'activation d'un RCPG ont été proposés (Lohse et al., 2015). Dans le premier modèle qui est le plus simple, un agoniste A se lie à une forme inactive du récepteur  $R_i$  pour former un complexe  $AR_i$  qui subit ensuite plusieurs modifications conformationnelles pour aboutir à un état actif  $AR_a$ . Ce modèle simplifié ne permet pas d'expliquer les différentes réponses observées pour un grand nombre de récepteurs, d'où l'idée de proposer des modèles d'activation faisant intervenir plusieurs états actifs du récepteur. (Samama et al., 1993 ; Leff, 1995 ; Weiss 2020).

Dans le cas du modèle ternaire simplifié, l'activation du récepteur est suivie par la liaison de la protéine G sur un état actif du récepteur différent de celui induit par la liaison du ligand. Le complexe  $AR_a G$  qui en résulte peut alors activer l'effecteur (Dery et al., 2017).

Le modèle ternaire étendu rajoute une situation dans laquelle le récepteur peut être activé sans liaison d'un agoniste, et peut également activer la protéine G sans avoir lié son ligand. Ce modèle complexe ternaire étendu (modèle à deux états) a été proposé en réponse à la découverte que les récepteurs pouvaient adopter une conformation active spontanément, en absence d'agoniste et être couplés aux protéines G (Samama et al., 1993 ; Leff, 1995 ; Lohse,2014). Le récepteur existerait en équilibre entre un état inactif  $R_i$  et une conformation active  $R_a$  (Samama et al., 1993 ; Lohse,2014). Cette isomérisation conformationnelle du récepteur (passage de  $R_i$  à  $R_a$ ) nécessite soit la fixation d'un ligand, soit des changements conformationnels spontanés. Ce modèle introduit de plus une constante décrivant la coopérativité entre le site de liaison à la protéine G et le site de liaison au ligand orthostérique, se fixe sur le même site que le ligand endogène (Oakley et al., 2013). Cela impliquait que plus d'un site de liaison existait sur le récepteur : au moins un pour le ligand orthostérique et un pour la protéine G. Ces concepts ont donné lieu au modèle ternaire puisque nous sommes en présence de multimères avec plusieurs sites de liaisons : site du ligand, site de la protéine G, site du GTP par (Quiniou,2015).

En l'absence d'agoniste, l'état inactif est dominant, L'agoniste entier présente une forte affinité pour la forme active du récepteur dans la conformation  $R_a$ , et une faible affinité pour sa forme inactive ( $R$ ). Sa fixation sur le récepteur favorise le déplacement de l'équilibre vers  $R_a$  ce qui permet d'augmenter le nombre des protéines G activées. A l'opposé, les agonistes inverses présentent une haute affinité pour la forme inactive du récepteur et une faible affinité pour sa forme active

(figure 30). Ils suppriment l'activité basale intrinsèque du récepteur en stabilisant le récepteur dans la conformation inactive Ri, déplaçant l'équilibre à partir de l'état Ra. (Barker et al., 1994 ; Chidiac et al., 1994 ; Quiniou,2015).



Agoniste –Antagoniste –Agoniste inverse  
Amplitude de la réponse est fonction de l'activité intrinsèque(  $\alpha$  )

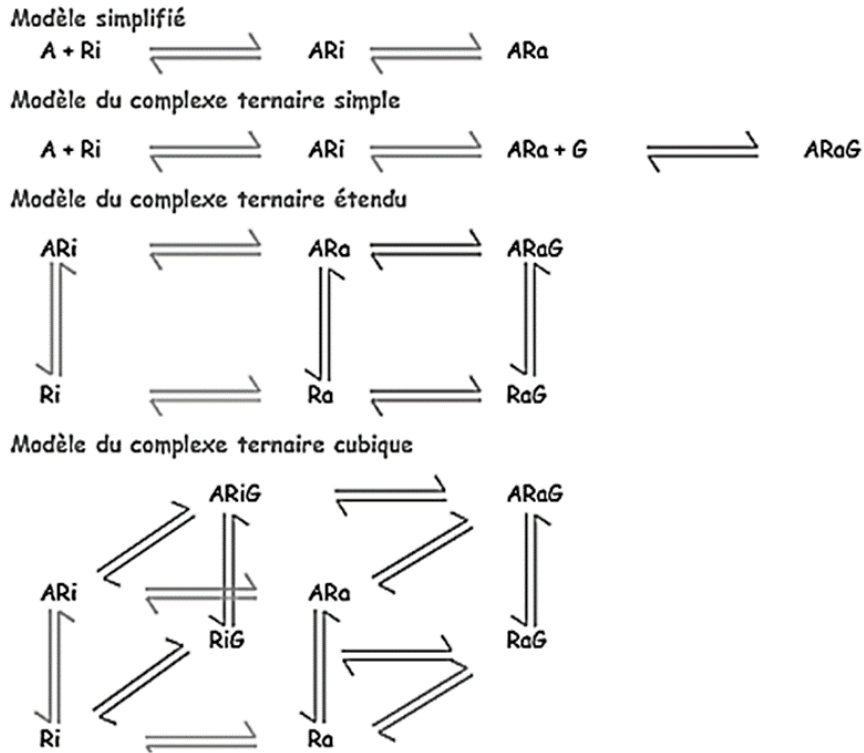
**Figure 30** : Présentation des différents types de ligands.

L'activité intrinsèque ( $\alpha$ ) représente la capacité d'un récepteur liant le ligand à induire une réponse (réponse physiologique mesurable dans un tissu, un organisme...).

L'efficacité représente l'influence d'une substance au niveau moléculaire (force de l'agoniste à favoriser la conformation favorable du récepteur).

Les antagonistes sont alors définis comme des ligands intermédiaires capables de lier avec la même affinité les états conformationnels Ri et Ra du récepteur n'induisant donc pas de modification de l'équilibre (Samama et al., 1993 ; Leff, 1995 ; (Quiniou,2015). L'antagoniste compétitif bloque l'activité de l'agoniste en s'opposant à sa liaison sur le récepteur. Il se distingue de l'antagoniste non compétitif qui se fixe sur des sites différents de celui de l'agoniste (sites allostériques) mais empêche les changements conformationnels nécessaires à l'induction d'une réponse biologique figure (31).

Le modèle cubique ternaire permettait d'inclure le potentiel des récepteurs (liés ou non liés par l'agoniste inverse) à séquestrer les protéines G dans une conformation inactive (Quiniou, 2015).



**Figure 31** : Différents modèles proposés pour l'activation des RCPG : activation du récepteur par fixation du ligand A (Tiré de Kenakin, 2004)

(A : Ligand ; Ri : Récepteur inactif ; Ra : Récepteur actif ; G : protéine G)

Modèle à deux états. Les récepteurs sont en équilibre en une forme inactive (Ri) et active (Ra). Les ligands (A) peuvent se lier à la forme inactive et à la forme active  
 Complexe ternaire étendu.

Les récepteurs (R) forment des complexes en équilibre avec le ligand (L) et la protéine G hétérotrimérique (G).

Deux états différents du récepteur, inhibé (Ri) et actif (Ra). La liaison de la protéine G à la forme active du récepteur Ra mène à la réponse physiologique. Le ligand A lie à chacune des formes du récepteur ainsi qu'à la forme Ra liée à la protéine G. (Zhang,2014).

Le modèle du complexe ternaire cubique reprend le modèle du complexe ternaire étendu en y incluant les complexes entre la protéine G et le récepteur inactif (Weiss et al., 1996 ; Samama,2016). Les formes inactives du récepteur Ri et A/Ri peuvent dans ce cas interagir avec la protéine G sans pour autant conduire à un signal. (Kenakin, 2004 ; Zhang,2014).

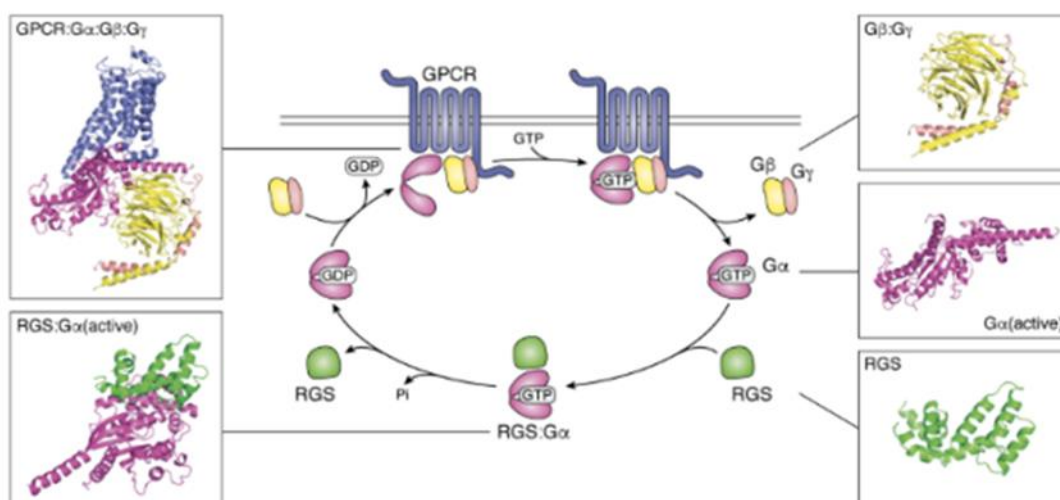
Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP (état 1) à un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G (état 2) et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  (état 3). Néanmoins, de nouvelles données obtenues par des approches de transfert d'énergie ont relancé le débat sur le degré d'association de

ces protéines au cours des processus d'activation formation d'un complexe inactif à trois partenaires (ligand – récepteur – protéine G) (Kenakin, 2004 ; Zhang,2014).

Sur la base des études pharmacologiques portant sur, les mécanismes moléculaires d'activation des RCPG, un modèle récent suggère que la liaison d'un agoniste partiel ou plein stabilise des états conformationnels distincts, qui sont associés à des niveaux d'activation différents des récepteurs. Ces différents états actifs sont définis par la capacité d'un ligand à rompre les interactions non covalentes qui stabilisent l'état basal. Le ligand se lie directement au niveau des acides aminés impliqués dans ces interactions et stabilise indirectement de nouvelles interactions intramoléculaires. Ces états conformationnels spécifiques d'un ligand donné peuvent être à l'origine des différentes voies de signalisation induites par un récepteur. (Ferre,2017).

### 3.1. Régulation par les RGS (Regulator of G protein Signalling) :

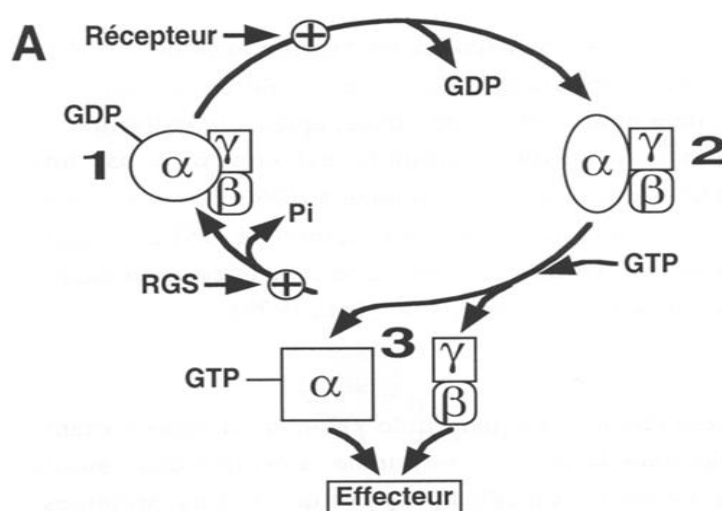
Les RGS (régulateurs de la signalisation des protéines G) jouent un rôle important dans la signa cellulaire en interagissant avec la sous unité  $\alpha$  des protéines G ( $G\alpha$ ) et en régulant leur activité (O'Brien et Roman, 2019). Une trentaine de protéines appartenant à la famille des RGS ont en commun un domaine spécifique comportant 23 résidus hydrophobes (Ross et Wilkie, 2000 ; Pfeffer, 2013). Certaines d'entre elles sont des protéines à multiples domaines renfermant un domaine RGS et des domaines aux fonctions diverses (Figure 32). La fonction principale attribuée aux protéines comportant un domaine RGS est d'augmenter l'activité ATPasique des protéines G hétérotrimériques analogue aux protéines GAP (GTPase-activating protein) intervenant dans le cycle d'inactivation des petites protéines-G de type Ras. Les protéines RGS agissent comme des régulateurs négatifs de la signalisation protéines-G dépendante en accélérant l'activité GTPasique des sous-unités  $G\alpha$ . (Pfeffer, 2013).



**Figure 32 :** Cycle d'activation d'une protéine G régulé par les protéines RGS. D'après (O'Brien et Roman, 2019).

Une famille de protéines, les RGS, a été identifiée pour sa capacité à réguler le signal des RCPG pour leur rôle dans l'inhibition des protéines G. Ces protéines sont des GAP (GTPase-Accelerating Protein). (McCudden et al. 2005 ; Weiss 2020).

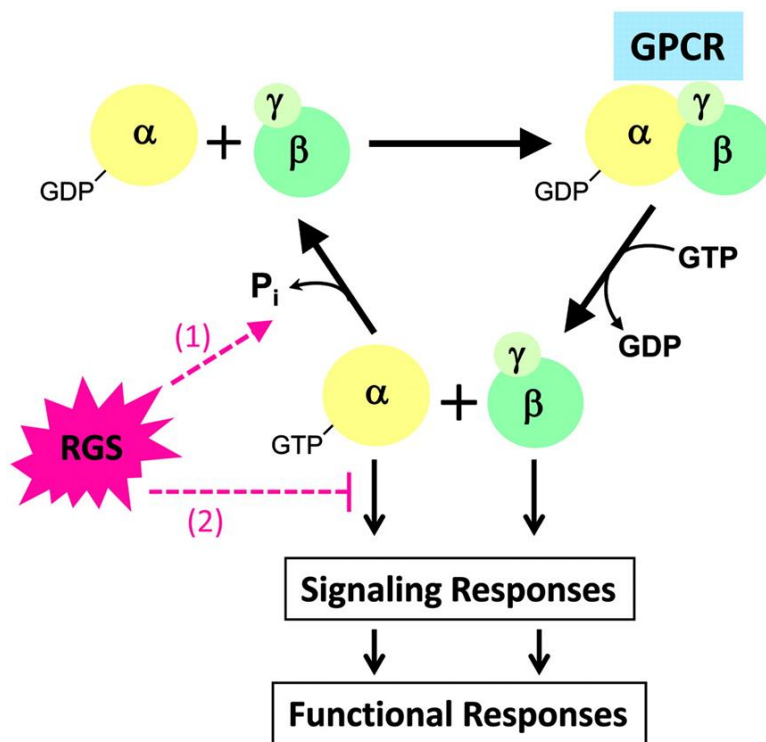
Les RGS ne possèdent pas d'activité GTPasique mais elles modulent le signal des RCPG en accélérant le taux d'hydrolyse du GTP par la sous unité  $\alpha$  réduisant ainsi la durée et l'amplitude du signal des RCPG dépendant des protéines G. La protéine G retourne alors dans son état inactif, liée au GDP. Puisqu'elles facilitent la réassociation de la sous unité  $\alpha$  avec le complexe  $\beta\gamma$ . Les RGS inhibent également la signalisation induite par le dimère  $\beta\gamma$  (Bar-Sagi et Hall, 2000 ; Rajalingam et al., 2007 ; Weiss 2020). La famille des RGS comprend plus de 30 membres, dont les tailles varient de 17 à 160 kDa et qui peuvent être soit membranaires soit cytosoliques (Figure 33). Les RGS les mieux caractérisées (RGS1 et RGS4). La structure de ces protéines consiste en un domaine RGS de 120 résidus par lequel elle lie la sous-unité  $\alpha$  et qui est responsable de la fonction GAP. Deux classes de RGS ont été identifiée : les petites protéines RGS (160 à 217 aa) qui ne possèdent que le domaine RGS entouré par de courtes extrémités N- et C-terminales et les grandes protéines RGS (372 à 1387 aa) qui contiennent des motifs additionnels permettant des liens entre les protéines G hétérotrimériques et d'autres voies de signalisation. Le rôle de ces protéines est de permettre la réassociation de l'hétérotrimère en fin de cycle (Chasse et Dohlman 2003 ; Roman, 2019).



**Figure 33** : Cycle d'activation et d'inactivation des protéines-G : un ménage à quatre.

A : La protéine-G hétérotrimérique est inactive dans l'état-1 (la sous-unité  $\alpha$  contient du GDP). Le récepteur activé stimule la libération du GDP. L'état-2 est caractérisé par l'absence de nucléotide au sein de la sous-unité  $\alpha$ . Le GTP s'associe rapidement au site nucléotidique. Il se produit alors une dissociation entre les partenaires : le récepteur, la protéine  $\alpha$ -GTP et le complexe  $\beta\gamma$ .  $\alpha$ -GTP, d'une part, et  $\beta\gamma$ , d'autre part, s'associent avec des effecteurs identiques ou différents pour en modifier l'activité. L'hydrolyse du GTP met fin à l'interaction  $\alpha$ -GTP-effecteur.  $\alpha$ -GTP s'associe alors à  $\beta\gamma$  et met fin à

l'association de  $\beta\gamma$  avec son propre effecteur. Les protéines RGS (Regulator of G protein signaling) interviennent dans le cycle d'inactivation des protéines-G trimériques en accélérant la vitesse d'hydrolyse du GTP (figure 34) selon les travaux de Bockaert et Pin, 1998 ; Roman, 2019.

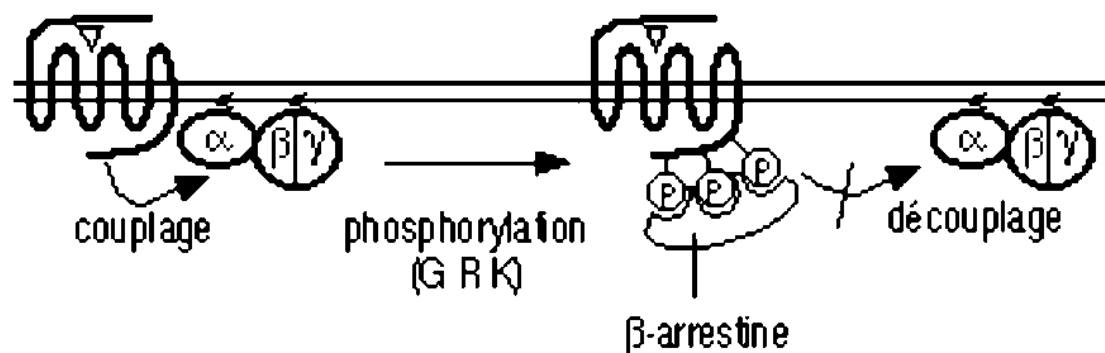


**Figure 34** : régulation de la signalisation des Protéines

- 1) : une accélération marquée de l'activité  $G\alpha$  GTPase, qui diminue à la fois les effets en aval médiés par  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ .
- 2) : la compétition avec les effecteurs en aval pour la liaison à  $G\alpha$  activé, qui inhibe uniquement  $G\alpha$ .

### 3.2. Désensibilisation des RCPG :

La désensibilisation se définit comme une diminution ou une absence de la réponse d'un récepteur suite à l'application continue ou répétée d'un agoniste (Landry et Gies, 2018). Elle traduit un découplage entre le récepteur et ses effecteurs intracellulaires, permettant d'éviter les effets potentiellement néfastes de leur stimulation prolongée. Bien qu'étant un phénomène général, la désensibilisation met en jeu différents mécanismes et acteurs en fonction du type de récepteur (figure 35,36) rapporté par les travaux de Scheffzek et al., 1997 ; Roman, 2019.

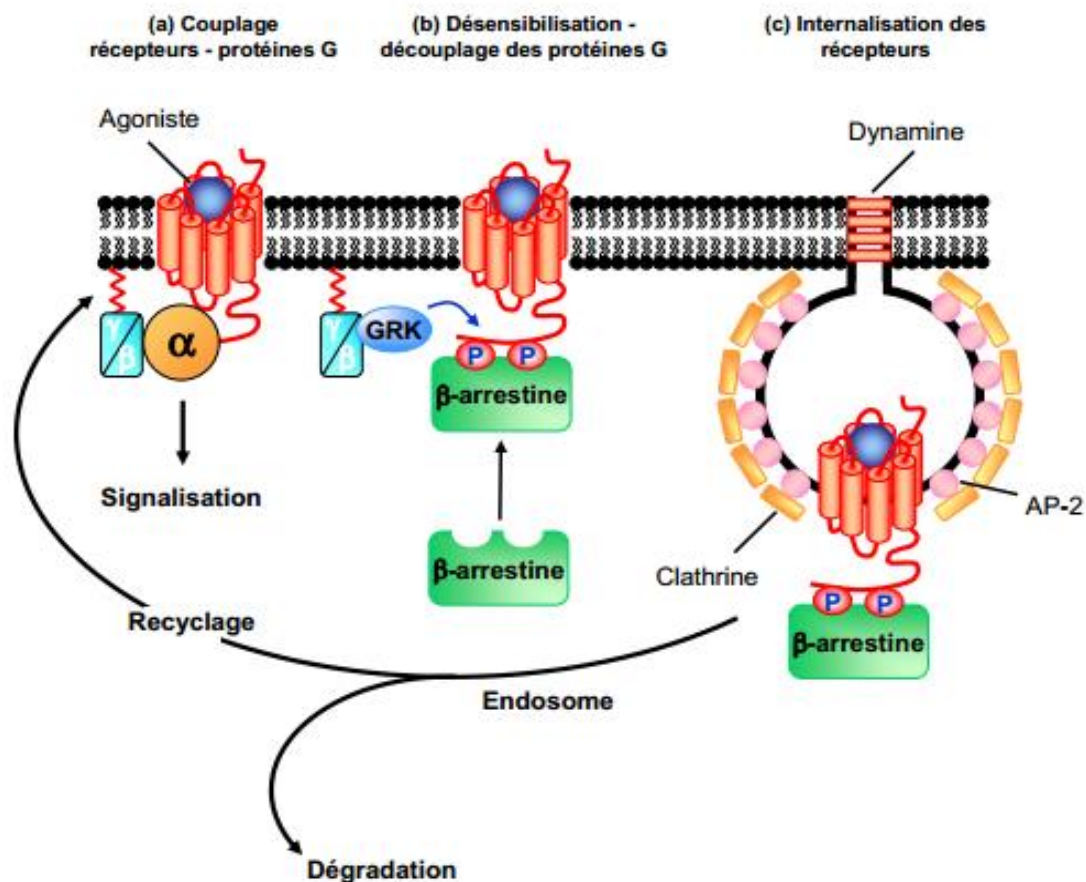


**Figure35 :** Exemple dans le cas d'un récepteur couplé à une protéine G. La phosphorylation par des kinases spécifiques facilite l'interaction avec des protéines (arrestines) perturbant le couplage de la protéine G. (Wang et al., 2017).

L'activation d'un RCPG par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Pour être effective cette régulation nécessite un découplage entre le récepteur et la protéine G. Pour cela, le récepteur doit d'abord être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine, localisés dans son extrémité C terminale (Bouvier et al., 1988 ; Hausdorff et al., 1989 ; Lohse et al., 1990 ; Salahi 2014).

Trois classes de protéines kinases susceptibles de réaliser cette phosphorylation se distinguent : les protéines kinases A ou C (PKA, PKC) activées par les seconds messagers (AMPC, calcium et DAG) qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel (Hausdorff et al., 1989 ; Salahi 2014) et les GRK ("G protein receptor kinase") plus spécifiques des RCPG, qui phosphorylent le récepteur dans sa conformation active (Ferguson et al., 1996 ; Lohse et al, 1989 ; Salahi 2014).

Cette phosphorylation favorise leur interaction avec des protéines cytosoliques, les  $\beta$ -arrestines. Cela a pour conséquence de découpler les RCPG de leur protéine G et provoque l'internalisation des récepteurs (Lohse et al., 1990 ; Arrault 2018). Cette étape de translocation marque l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur activé. Une fois à la membrane, la  $\beta$ -arrestine devient un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en permettant la formation des puits recouverts de clathrine, indispensables à l'internalisation du récepteur. Le récepteur une fois internalisé peut suivre deux voies : soit il est dirigé vers des endosomes de recyclage, soit il est orienté vers le compartiment lysosomal, (Dery et al., 1999 ; Zhang et al., 1996 ; Salahi ,2014). Le pH acide des endosomes de recyclage peut favoriser la dissociation entre le ligand et le récepteur (Krueger et al., 1997 ; Arrault 2018). Le récepteur « vidé » de son ligand peut alors reprendre sa conformation de repos, être déphosphorylé par des phosphatases et être recyclé à la membrane plasmique : on parle de désensibilisation (Oakley et al., 2000 ; Arrault 2018).



**Figure 36 :** Représentation schématique des grandes étapes de la désensibilisation des RCPG.

(a) activation d'un RCPG par un agoniste et déclenchement d'une signalisation cellulaire induite par les protéines G.

(b) phosphorylation du domaine carboxy-terminal du récepteur par des GRK (G protein – coupled Receptor Kinase) et recrutement de la β-arrestine cytoplasmique au niveau du récepteur avec en parallèle un découplage de la protéine G.

(c) formation des puits recouverts de clathrine et endocytose des récepteurs qui sont soit recyclés à la membrane plasmique soit dégradés via leur orientation vers les compartiments lysosomiaux (Maurel ,2017).

### **4. Les protéines G monomériques :**

#### **4.1. Les petites protéines G :**

Les petites protéines G sont ainsi nommées en raison de leur faible poids moléculaire (pouvant varier de 20 à 35 kDa), car contrairement aux protéines G hétérotrimériques, elles ne sont composées que d'une seule sous unité. Elles sont toutes activées par l'échange du nucléotide GDP par du GTP (Yang, 2002 ; Maurel 2017).

De plus de 60 petites protéines G ont été identifiées et divisées en six classes : Ras GTPases, Rho GTPases, Rab GTPases, Arf GTPases, Ran GTPases et Rad GTPases et agissent toutes comme des interrupteurs moléculaires. Chaque classe possède des fonctions qui lui sont propres (Rajalingam et al, 2007 ; Serge 2014). Les protéines de la famille Rho GTPases assument la responsabilité de l'organisation du cytosquelette tout en participant également à la régulation de la croissance cellulaire. La famille des Ras GTPases est impliquée dans la prolifération cellulaire, dans la différenciation, dans l'apoptose et dans la modulation de la transcription génique (Bar-Sagi et Hall, 2000 ; Licuw 2021).

##### **4.1.1. La famille des RHO GTPase :**

Sous la forme liée au GTP , les protéines Rho sont capables d'interagir avec différentes protéines effectrices , telles que des Ser/Thr kinases :Rho-kinase, PKN, (Heasman et Ridley, 2008 ; Boussif,2018), des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (phosphoinositides kinases, phospholipase D) ou des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction de différents signaux, dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, la motilité cellulaire, le trafic vésiculaire, le transport noyau/cytoplasme, la prolifération, la différenciation, l'apoptose. (figure 37) selon les travaux de Manneville et Hall, 2002 ; Salahi 2014.



**Figure 37** : structure des protéines RHO.

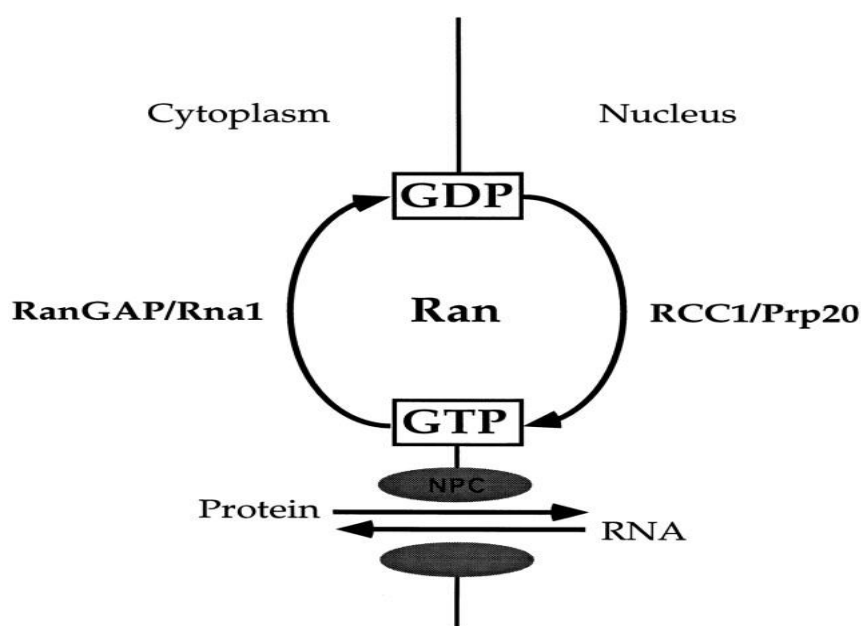
#### **4.1.2. La famille des Ras GTPase :**

La famille Ras GTPase, constitue une famille de trois protéines, est considérée comme l'archétype des protéines liant le GTP. Les protéines Ras furent découvertes comme des composants transformants (parce que capables d'induire des tumeurs) isolés à partir de rétrovirus, tels que le virus du sarcome d'Harvey (H-Ras) et celui du sarcome de Kirsten (K-Ras). Le troisième membre de la famille, N-Ras, a été découvert dans une lignée cellulaire de neuroblastome, comme un composant transformant ayant une homologie avec Ras (Udod et al., 1989 ; Ridley, 2015). Les Ras sont toutes composées d'une, liée à la membrane par une queue lipidique constituée par des isoprénoïdes et des acides gras saturés. Elles interviennent dans les voies de signalisation en aval des récepteurs des facteurs de croissance. Les mutations de ras qui lui confèrent une activité GTPasique très faible, sont associées à de nombreux types de cancer (Ridley, 2015)

#### **4.1.3. La famille des Ran GTPases :**

Ran (protéine nucléaire liée à Ras) GTPase fait partie de la superfamille Ras. Cependant, Ran n'a pas le motif CAAX à son extrémité C-terminale. Ran existe dans deux états, Ran GTP et Ran GDP, formant le cycle Ran. L'équilibre entre ces deux

états est maintenu par l'action du facteur d'échange de nucléotides guanine du régulateur de la condensation chromosomique 1 (RCC1), convertissant le GDP en GTP. Ran régule le transport nucléo-cytoplasmique des molécules à travers le complexe de pores nucléaires et contrôle la progression du cycle cellulaire grâce à la régulation de la polymérisation des microtubules et de la formation du fuseau mitotique (Jaffe et Hall ; 2019). La perturbation de l'expression de Ran a été liée au cancer à différents niveaux - de l'initiation du cancer à la métastase. (Figure 38) rapporté par les travaux de Sazer et Dasso, 2000 ; Jaffe 2017).



**Figure 38** : fonctionnement des protéines Ras-like nuclear protein (Ran).

#### 4.1.4. Les familles des RabGTPase et les Arf/Sar GTPases :

Les Rab GTPases et les Arf/Sar GTPases participent au transport intracellulaire de protéines cargos en jouant un rôle dans la formation, la fusion et la motilité des vésicules entre les différents compartiments (Charles et al., 2018 ; Frémont et Echard, 2018 ; Kjos et al., 2018).

#### 4.2. Activation et inactivation des petites protéines G :

Elles sont ancrées à la face interne de la membrane plasmique elles coexistent sous deux formes inter convertibles : Une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. L'interaction d'une petite protéine G avec une protéine particulière en amont de la voie de signalisation entraîne au passage de cette dernière de l'état inactif à l'état actif. (Wennerberg et al., 2005 ; Charles, 2018).

Trois groupes de protéines participent au cycle d'activation des petites protéines G :

- A. Les GTPase dissociation inhibitors (GDI) :** qui maintiennent la protéine liée au GDP dans une conformation inactive. 2 GDI sont connues : Rab GDI et Rho GDI. Les GDI peuvent se lier avec les protéines possédant un résidu géranylgeranylé, libérant ainsi ces protéines de leur ancrage à la membrane. Cet éloignement de la membrane participe à l'inhibition des petites protéines G dont la probabilité d'activation dans le cytosol est plus faible (Ridley, 2015). De plus, les GDI couvrent le site de fixation des effecteurs, empêchent l'échange des nucléotides et inhibent l'hydrolyse du GTP par les petites protéines G. (Wennerberg et al., 2005 ; Frémont 2018).
- B. Les guanine nucléotides exchange factor protein, GEF (guanine nucleotide exchange factor) ;** qui catalysent l'échange du GDP par un GTP entraînent l'activation de la protéine G. La dissociation du GDP et des petites protéines G nécessite l'intervention d'une GEF qui participe à l'échange du GDP par un GTP en stabilisant les protéines G non liée au GTP ou en catalysant la dissociation du GDP de son site de fixation et en favorisant l'interaction avec le GTP (Charles, 2018). Cependant, la stabilisation de la forme non liée de la protéine G augmente l'exposition du site de fixation du GTP mais également favorise la dissociation de la GEF. Les GEF possèdent plusieurs sites d'interaction protéine-protéine et protéine-lipide. Ces sites leur permettent d'être recrutées à la membrane et agissent en réponse à un signal extracellulaire. (Toshio et all ,2003 ; Kjos 2018).
- C. Les GTPase activating protein, GAP (GTPase Activating Protein)** qui catalysent l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine G et participent à l'inactivation de la protéine G (Frémont et Echard, 2018). Les GAP interagissent avec le domaine GTPase de la protéine et favorisent la réaction d'hydrolyse du GTP. Elles favorisent l'alignement des molécules d'eau avec le site catalytique des protéines accélérant ainsi la catalyse du GTP. De plus, elles favorisent la stabilité de la protéine et facilitent l'interaction de la protéine avec le GTP. (Kjos et al., 2018).

### 4.3. Cycle d'activation et d'inactivation des GTPases de la famille Rho :

Les Rho-GTPases oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Leur cycle d'activation est régulé par des régulateurs positifs les GEF, catalysant l'échange GDP/GTP ; et par des régulateurs négatifs, les GAP, favorisant le retour à l'état inactif et les Rho-GDI, qui séquestrent les Rho-GTPases empêchant leur interaction avec leurs régulateurs et leurs effecteurs (Sazer et Dasso, 2000 ; Arrault 2018).

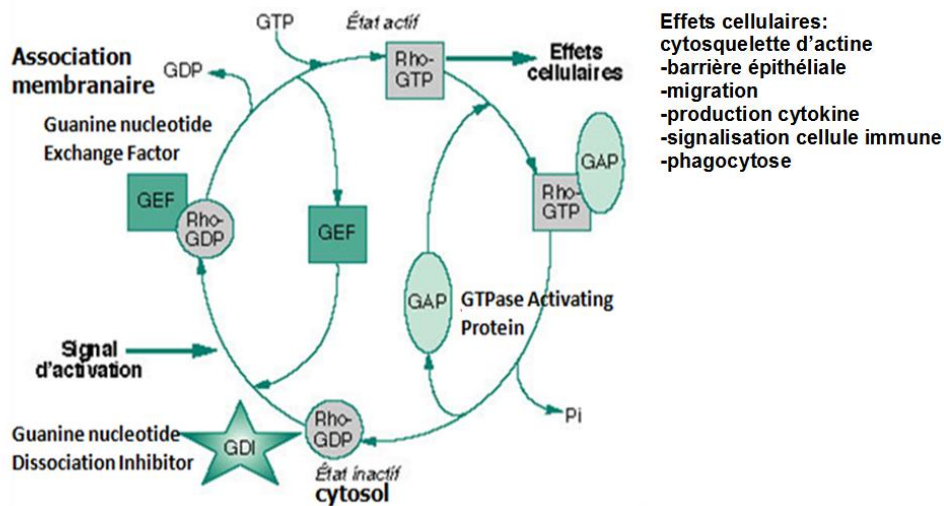
Dans la cellule, à l'état basal la protéine G inactive est liée au GDP et complexée à GDI dans le cytosol. GDI maintient cet état inactivé en stabilisant la forme GDP et en masquant le domaine C-terminal de ciblage à la membrane (Lambright, 2017). La forme GDP peut se réassocier aux membranes lorsqu'elle se dissocie du GDI. (Mossessova et al., 1998 ; Floquet 2016).

Lorsqu'un signal d'activation arrive en amont, d'une part GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) se dissocie, permettant l'association de la protéine G à la membrane, d'autre part les GEFs (guanine nucleotide exchange factor) induisent la dissociation du GDP pour permettre l'association du GTP (figure 39,40). La liaison du GTP induit un changement de conformation dans la région effectrice de la protéine G qui permet alors son interaction avec ses effecteurs. (Bos et al., 2007 ; Floquet 2016).

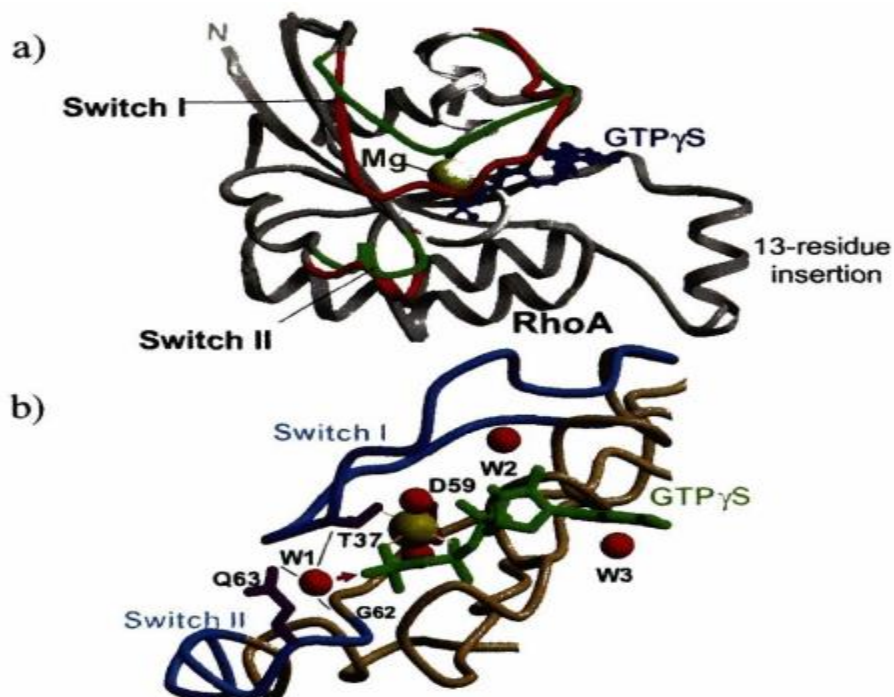
La fin du signal est assurée par l'hydrolyse du GTP et le retour à l'état GDP, catalysé par des GAPs (GTPase activating protein). Après retour à l'état GDP, (Ishida et al., 2016).

Rho est extrait des membranes par GDI et retourne dans le cytosol. (Segev, 2018).

La forme active est localisée au niveau de la membrane plasmique où elle se lie aux effecteurs. La forme inactive est cytoplasmique. (Figure 39).



**Figure 39 :** Cycle d'activation et d'inactivation des GTPases de la famille Rho.



**Figure 40 :** Changements conformationnels dans les régions de commutation et les molécules d'eau autour du site de liaison aux nucléotides de guanine.

(a) Superposition du tracé d'atomes de carbone RhoA Ca des formes liées au GTP et au GDP. Les régions de commutation dans les formulaires liés au GTP (PDB id : 1A2B) et au GDP (1FTN) sont respectivement surlignées en rouge et en vert. GTPYS et Mg<sup>2+</sup> sont affichés sous forme de modèles boule-et-bâton et remplis d'espace.

(b) Vue rapprochée du site de liaison aux nucléotides de guanine sous la forme liée au GTP. Les molécules d'eau et le Mg<sup>2+</sup> sont affichés respectivement sous forme de boules rouges et jaunes. Toutes les figures sont faites en utilisant Molscript et Radter3d. Trois molécules d'eau, fréquemment observées dans les structures cristallines des Rho GTPases, sont également représentées par des boules rouges (W1-W3). W1 est la molécule d'eau nucléophile putative proche du groupe  $\gamma$ -phosphate. W1 est stabilisé par des interactions de liaison hydrogène avec la chaîne latérale de Gln63 et les chaînes principales de Thr37 et Gly62. W2 et W3 médient les interactions RhoA avec le ribose et la base guanine du GTP, respectivement (Hakoshima et al 2003 ; Marts 2015).

### 5. Protéine G et pathologies :

Les protéines G sont incriminées dans plusieurs maladies. Ainsi, toute perturbation dans leur fonctionnement peut conduire à des pathologies comme l'allergie, l'hypertension artérielle, la maladie d'Alzheimer ou encore la schizophrénie (Lohse et al., 1990 ; Stuart 2019).

Ras, qui constitue une famille de trois protéines monomériques, liant le GTP. Les protéines Ras furent découvertes comme des composants transformants (capables d'induire des tumeurs) isolés à partir de rétrovirus, tels que le virus du sarcome d'Harvey (H-Ras) et celui du sarcome de Kirsten (K-Ras). Le troisième membre de la famille, N-Ras, a été découvert dans une lignée cellulaire de neuroblastome, comme un composant transformant ayant une homologie avec Ras. Les Ras interviennent dans les voies de signalisation en aval des récepteurs des facteurs de croissance. Les mutations de ras qui lui confèrent une activité GTPasique très faible, sont associées à de nombreux types de cancer. (Malaney, 2016).

D'autres études récentes démontrent que la sous-famille des récepteurs couplés aux protéines G qui lient les hormones glycoprotéiques hypophysaires TSH et LH, et qu'il permet d'expliquer certaines maladies humaines. (Parma et al 2014). Démonstrent que des mutations somatiques dans la troisième boucle cytoplasmique du récepteur de la TSH sont responsables du développement d'adénomes thyroïdiens hyperfonctionnels (Oford ,2003 ; Shenker ,2019). L'une des deux mutations identifiées affecte une alanine, homologue dans le récepteur TSH de l'Ala293 du récepteur  $\alpha 1\beta$  adrénergique. Lorsqu'ils sont introduits dans des cellules COS par transfection, les récepteurs mutés provoquent une accumulation d'AMPc supérieure à celle occasionnée par le récepteur sauvage. L'AMPc étant le stimulant naturel de la fonction et de la croissance du thyrocyte , cette observation explique l'expansion clonale de l'adénome, ainsi que l'hyperthyroïdie dont il est la cause . (Shenker et al,2019) , quant à eux, présentent une observation très semblable qui affecte le gène du récepteur de la LH dans des familles dans lesquelles ségrège une maladie autosomique rare, la puberté précoce familiale masculine. Il s'agit ici d'une mutation germinale dans le sixième segment transmembranaire du récepteur de la LH (Asp<sup>578</sup> ---.Gly) . L'activation constitutive du récepteur qui en résulte est responsable du déclenchement de la stéroïdogénèse par la cellule de Leydig et, partant, de la puberté précoce. (Oprian, 2021). Qui ont identifié des mutations activatrices du gène de la rhodopsine dans certaines formes de rétinopathie pigmentaire, montrent que les récepteurs couplés aux protéines G peuvent être responsables de maladies génétiques humaines, somatiques ou héréditaires, par gain de fonction. (Maurel,2014).

On connaît déjà un certain nombre de maladies dues à des mutations de récepteurs couplés à des protéines G provoquent des troubles du métabolisme du calcium. L'hypercalcémie hypocalciurique familiale (HHF) reconnaît une hérédité autosomique dominante (Daly ,2001 ; Oprian, 2021).

## **Revue bibliographique**

---

L'oncogène RAS est l'un des gènes les plus importants dans l'apparition des cancers puisqu'environ 20 à 30 % des tumeurs possèdent une mutation pour cette protéine G monomérique. La superfamille des Ras se divise en 6 groupes : Ras, Rho, Rab, Ran, Rad et ARF. En particulier, le rôle des protéines ARF (ADP-ribosylation factors) dans cette réponse cellulaire est maintenant reconnu (Hibert MF et al. 1993 ; Stuart 2019).

La toxine cholérique (TxC) inhibe l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité  $\alpha$ . Le RGS n'a donc aucun effet et la protéine G reste longtemps activée (choléra). Donc il y a une stimulation massive d'adénylate cyclase, donc une accumulation d'AMPc. Les liquides ne sont plus absorbés dans l'intestin ce qui cause une déshydratation, et ils sont éliminés dans les fèces ce qui cause d'importantes diarrhées. (Zhang et al., 2005 ; Shenker, 2019).

### 6. Docking moléculaire

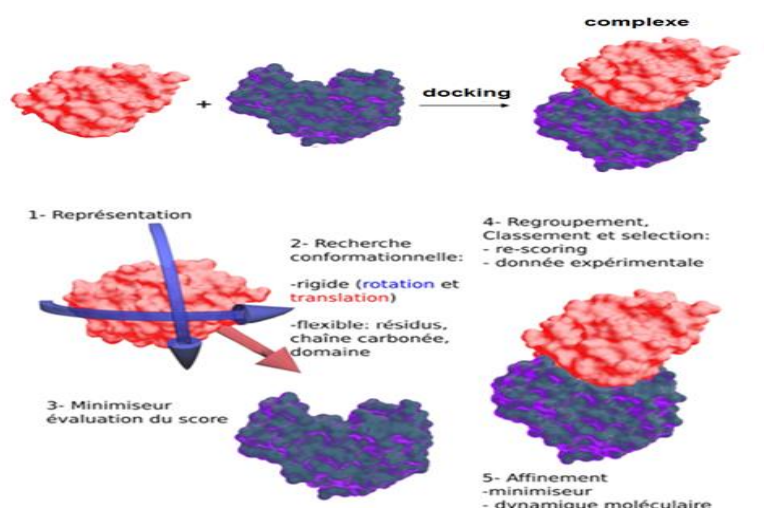
Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques, les identifier est une étape importante dans la conception de composés pouvant être utilisés en thérapie. Cette information s'obtient directement par le docking (ancrage ou amarrage). Rapporté par les travaux de Grosdidier, 2007.

Le docking est technique informatique qui permet la détermination des conformations les plus favorables pour la fixation du ligand à la cible conduisant à la formation du complexe le plus stable. (Renvez, 2010).

Le Docking moléculaire ou amarrage moléculaire vise à la prédire la conformation et l'orientation d'un ligand dans le site actif de la protéine, combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules (SEURET, 2003). Ce criblage rend possible la sélection des molécules dont l'activité biologique est la plus probable. (Halle,2002).

Les étapes du Docking moléculaire implique deux étapes fondamentales :

- La première (searching) ou Docking, consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables (figure 41). Selon les travaux de Gruebele et Schulten K, 2008.
- Le Scoring est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine, et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposée. Le meilleur résultat pour le docking est le complexe protéine –ligand avec la faible énergie. (Derreumaux, Mousseau, 2007).



**Figure 41** : les différentes étapes du docking moléculaire (Férey et al.,2008).

### 6-1 Les fonctions de scoring :

Les méthodes de "scoring" sont utilisées pour évaluer et classer les poses de liaison entre un ligand et une cible (récepteur). Elles sont utilisées pour prédire quelle pose de ligand a la plus forte affinité ou probabilité d'interaction avec la cible. (Hayward et al., 1997).

Cette fonction contient des termes additifs des énergies des liaisons hydrogène, des interactions ioniques, des contacts lipophiliques et d'entropie du ligand (la flexibilité du ligand), le score est une estimation directe du  $\Delta G$  : l'énergie libre du complexe protéine ligand. (Brooks et Karplus, 1985).

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéin}}$$

L'utilisation des fonctions de scoring est double. Elles permettent de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné. Cette conformation est appelée première pose. L'autre utilisation des scores est de pouvoir classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses. (Marrink et al., 2007).

Il y a trois types de fonctions de scoring :

#### 6-1 -1 Fonctions de score basées sur un champ de force :

Un champ de force classique est utilisé pour évaluer la somme de l'énergie d'interaction du complexe (ligand-Récepteur) et l'énergie interne du ligand. Il prend en compte les interactions électrostatiques, les forces de van der Waals, les liaisons covalentes, les angles de liaison, les angles de torsion, etc. L'effet du solvant peut également être pris en compte de manière implicite. (Tama et al., 2000).

#### 6-1-2 Fonctions de score empirique :

Les fonctions empiriques font appel à des paramètres déterminés par l'expérience, telle que l'énergie de liaison par exemple. Cette approche a l'avantage d'être très rapide, car les termes sont simples à calculer. Elles utilisent des paramètres statistiques ou des modèles d'apprentissage automatique pour prédire l'affinité entre le ligand et la cible. (Gabow, 2000).

#### 6-1-3 Les fonctions basées sur la connaissance « de type knowledge-based » :

Les scores basés sur les connaissances sont des fonctions de score utilisées en docking moléculaire qui permettent d'intégrer des informations biologiques et des connaissances spécifiques pour évaluer les poses de liaison ligand-cible. Des règles définissant la géométrie préférentielle, des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques. (Wriggers et Schulten, 1997).

La meilleure façon d'évaluer les complexes issus de la recherche conformationnelle est donc de combiner les informations obtenues par différentes méthodes. (Alexandrov et Shindyalov ,2003).

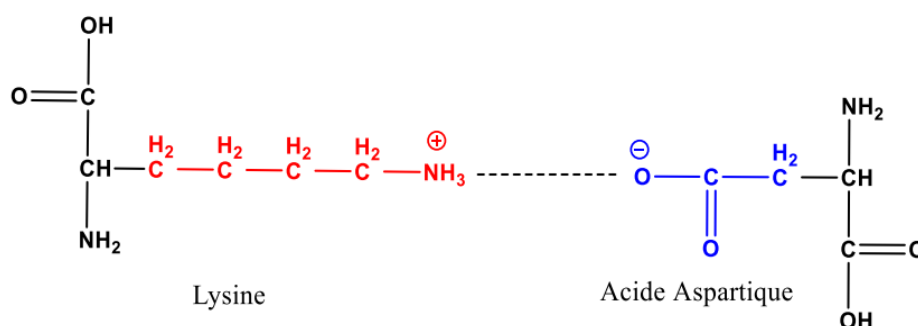
### 6-2 Nature des forces interactions :

Les interactions entre un ligand et une protéine peuvent être classées en plusieurs catégories :

#### 6-2-1 Interactions électrostatiques :

Les charges électriques opposées entre les résidus de la protéine et les atomes du ligand peuvent conduire à des interactions électrostatiques. Les acides aminés chargés positivement, tels que l'arginine et la lysine, peuvent interagir avec les atomes chargés négativement du ligand, tandis que les acides aminés chargés négativement, tels que l'acide glutamique et l'aspartique, peuvent interagir avec les atomes chargés positivement du ligand. Ces interactions électrostatiques agissent à « longues » distances (autour de 10 Å), entre des groupes d'atomes électriquement chargés (Figure 42). Rapporté par les travaux de (Gershel, 1995).

Les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes sont considérées comme les principaux facteurs responsables des propriétés des protéines telles que l'organisation structurale, la stabilité ainsi que les propriétés fonctionnelles. L'énergie de cette liaison est de 8,0 à 21,0 kJ /mol. (Milburn et Gerstein ,2004).



**Figure 42** : représentation schématique de de l'interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique. (Khalil, 2016).

#### 6-2-2 Interactions hydrophobes :

Les interactions hydrophobes sont dues à la tendance des molécules hydrophobes à se regrouper pour minimiser leur exposition à l'eau. Ils forment dans la structure des protéines des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent échanger aucune liaison avec les radicaux d'acides aminés (Langmuir, 1991) Selon les travaux de Tokuriki et Tawfik, 2009. Les résidus d'acides aminés hydrophobes de la protéine peuvent interagir avec les parties hydrophobes du ligand. (Clark, 2009).

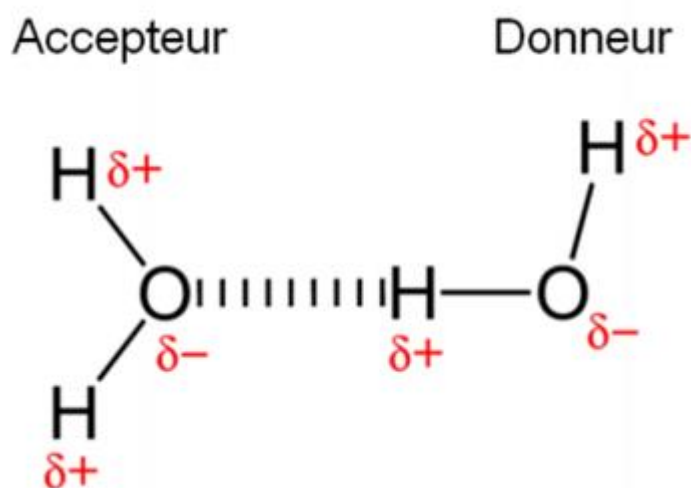
Ces interactions hydrophobes sont énergétiquement favorables car elles minimisent les interactions entre les résidus non polaires et l'eau. (Jahn et Radford ,2008).

### 6-2-3 Interactions de Van der Waals :

Ces interactions sont dues aux fluctuations des charges électriques dans les atomes et aux dipôles induits. Ces interactions Van Der Waals s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes de surface (Helms, 2007). Elles peuvent être importantes pour les interactions entre des molécules de petite taille, telles que les ligands et les résidus d'acides aminés non polaires. ( Freindorf et all,2005).

### 6-2-4 Interactions pont-hydrogène :

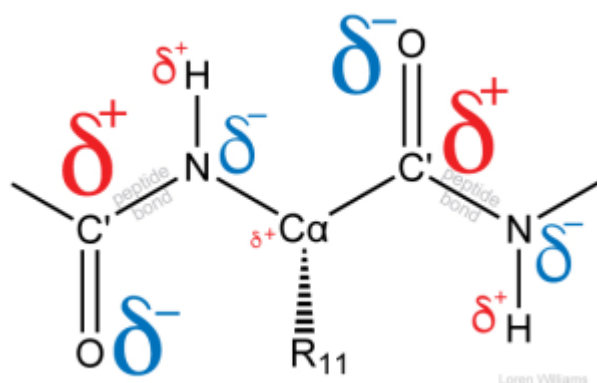
Les liaisons hydrogène peuvent se former entre des atomes donneurs d'électrons tels que l'oxygène et l'azote et des atomes accepteurs tels que l'azote et l'oxygène (Figure 43), respectivement. Les résidus d'acides aminés tels que la sérine, la thréonine, la tyrosine et l'histidine peuvent former des liaisons hydrogène avec des ligands contenant des groupes hydroxyles, des groupes carbonyles ou des groupes amides. (Isaacs et all, 1999). Les liaisons hydrogènes sont des interactions intermoléculaires de faible énergie entre 20 à 30 KJ /mol qui agissent dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0,8 à 2,8 Å). (Pauling et Corey ,1951).



**Figure 43** : Schéma d'une liaison d'hydrogène entre deux molécules d'eau.

### 6-2-5 Les interactions dipolaires :

Lorsque des atomes liés ont des électronégativités différentes, on observe la formation d'un moment dipolaire entre eux. Les moments dipolaires interagissent les uns avec les autres entre les molécules et dictent leur orientation respective. Les différences de polarité entre les atomes sont aussi à l'origine de charges partielles sur les atomes, comme dans la Figure44. (Berman,2000).



**Figure44** : Schéma de l'interaction dipolaires.

### 6-2-6 Interactions « $\pi$ - $\pi$ » et « cation- $\pi$ » :

Ce type d'interaction peut s'expliquer par la présence préférentielle de certains résidus, dont les résidus Arg, Trp et Tyr (Magis, 2007), au niveau des interfaces, de par leur aptitude à établir de interactions multiples (cation- $\pi$ ,  $\pi$ - $\pi$ ). Rapporté par les travaux de Munos,2009.

Les deux types de liaisons peuvent coexister le long d'un même axe, permettant l'établissement de liaisons doubles [ $\sigma\pi$ ] ou triples [ $\sigma\pi\pi$ ]. La rotation des groupements atomiques autour de leur axe de liaison n'est possible que dans le cas d'une liaison simple de type  $\sigma$ . (Fox et all,2001).

### 6-2-7 Les interactions entre systèmes $\pi$ :

La lettre  $\pi$  fait référence aux orbitales p dans la mesure où la symétrie de ces liaisons est la même que celle des orbitales p si l'on se place dans l'axe de la liaison (Hajduk et all ,2011). L'une des formes de ce type de liaisons fait intervenir des orbitales p, mais des orbitales d peuvent également former des liaisons  $\pi$ , ce qui entre en jeu dans les liaisons multiples métal-métal. (Bohacek et all ,1996).

Les liaisons  $\pi$  sont généralement plus faibles que les liaisons  $\sigma$ . La double liaison C=C, formée d'une liaison  $\sigma$  et d'une liaison  $\pi$ , a une énergie de liaison inférieure au

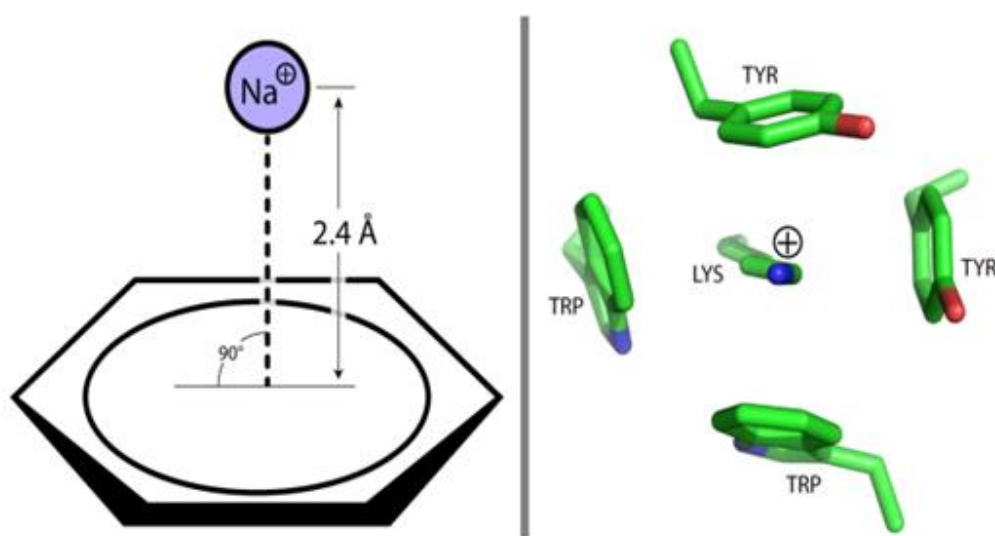
double de celle d'une liaison simple C–C, ce qui indique que la stabilité ajoutée par une liaison  $\pi$  est inférieure à celle d'une liaison  $\sigma$ . (Borsi et al., 2011).

Les interactions non liées  $\pi$ - $\pi$  impliquent des systèmes  $\pi$  comme les cycles aromatiques. Ces derniers sont très souvent présents dans les ligands organiques et dans les macromolécules biologiques. (Gershel, 1995).

Une liaison  $\pi$  est moins forte qu'une liaison  $\sigma$ , en moyenne, une liaison  $\pi$  entre deux atomes de carbone a une énergie de 250 kJ. Mol<sup>-1</sup>. (Milburn et Gerstein, 2004).

### 6-2-8 Les interactions cation- $\pi$ :

Un système pi, bien que neutre électriquement (comme le benzène) concentre des charges négatives (les électrons pi) au-dessus du plan de son anneau. Un cation peut alors engager une interactions électrostatique stabilisante avec ces charges. (Figure 45) selon les travaux de Tokuriki et Tawfik, 2009.



**Figure 45** : représentation schématique de l'interaction cation –  $\pi$ .

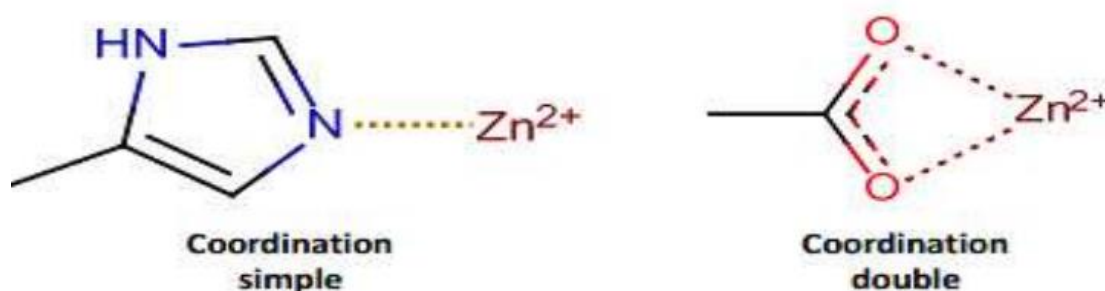
Un ion Na<sup>+</sup> peut engager une interaction avec les électrons pi du benzène. Un acide aminé lysine, chargé positivement peut aussi interagir avec les systèmes aromatiques d'autres acides aminés. (Langmuir, 1991).

### 6-2-9 Les interactions impliquant des métaux :

La liaison métallique est considérée comme une liaison forte (Figure 46). Cependant, elle n'est pas aussi forte que les liaisons covalente et ionique (  $\sim 1$  eV par paire liée), du fait des forces répulsives qui s'exercent entre les électrons libres de charge -e.

Ainsi, les métaux seront en général plus malléables que les cristaux ioniques et covalents. (Clark, 2009).

Les groupements chimiques possédant un doublet d'électrons non appariés peuvent former une liaison de coordination avec un cation métallique, dès lors qu'un site de coordination est libre au niveau de cet ion. (Jahn et Radford, 2008).



**Figure 46 :** Représentation schématique de la liaison de coordination ligand-ion métallique. (Helms, 2007).

Les résidus impliqués dans ce type d'interaction sont principalement l'aspartate, le glutamate, l'histidine et la cystéine, et les principaux ions métalliques rencontrés sont le zinc, fer, le calcium, le magnésium, le cuivre et le manganèse. (Freindorf et Shao, 2005).

### 6-3 Energie libre de liaison :

Les conformations du complexe sont ordonnées selon leurs énergies libres ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ) croissantes par la fonction de score formulées à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobiques}} + \Delta G_{\text{liaison hydrogène}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_0$$

Vdw : interactions de van der Waals.

$\Delta G_0$  : constante qui exprime la perte d'entropie due à la déformation du complexe

C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe (Bahar, 1997). Le principe thermodynamique est le suivant :

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{eq}} = \Delta H - T \Delta S = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}}$$

La constante d'équilibre  $K_{\text{eq}}$  (affinité de liaison), qui est le rapport de  $K_A$  ( $K_{\text{on}}$ ), constante d'association du complexe, sur  $K_D$  ( $K_{\text{off}}$ ), constante de dissociation. (Barkema et Mousseau, 1996).

L'énergie libre de liaison est égale à la somme des contributions enthalpiques et entropiques à la stabilité du complexe : enthalpies  $\Delta H$  (Energie d'interaction) et entropiques  $\Delta S$  (désordre) à la stabilité du complexe. (Yun, 2006).

T : température absolue

$K > 1$  et  $\Delta G_0 < 0$  : équilibre en faveur de [P-L]

$K < 1$  et  $\Delta G_0 > 0$  : équilibre en faveur de [P] et [L]

$K = 1$  et  $\Delta G_0 = 0$  : [P-L] = [P] [L]

### 6-4 Les logiciels de Docking

Le but d'un logiciel de docking est de prédire la structure tridimensionnelle d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules. (Bastard ,2003).

Dans le domaine de Docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions et les conformations les plus favorables du ligand au sein de son récepteur. (Gerstein et Krebs, 1998). Les résultats de docking dépendront totalement de la conformation du récepteur utilisée au départ. (Guieysse,2005).

Actuellement, un grand nombre de logiciels de Docking moléculaire sont disponibles tels que : GOLD, AUTODOCK, AUTODOCK VINA, FLEXX, SURFLEX, MOLEGRO VIRTUAL DOCKER, UCSF CHIMERA. (Alexandrov et Shindyalov, 2003).

Le protocole de la plupart des logiciels de docking développés se décompose en trois étapes (Derreumaux et Mousseau, 2007).

- I. Représentation du système.
- II. Algorithme de recherche, grâce auquel l'espace conformationnel de chacune des molécules est balayé.
- III. L'affinité entre les molécules dockées est testée par le biais d'une fonction, appelée fonction de scoring.

L'algorithme de docking doit calculer l'énergie de formation du complexe afin de déterminer si la réaction est favorable énergétiquement ou non. (Gruebele et Schulten, 2008).

## **7. partie pratique**

### 7-1 Les outils du docking moléculaire :

#### 7-1-1 Logiciel de docking :

Nous avons utilisé le logiciel MOE (Molecular Operating Environment), version 2014 pour la réalisation du docking moléculaire.

Le logiciel MOE de docking est un outil de modélisation moléculaire utilisé pour étudier les interactions entre les molécules. Dans le contexte de la recherche du site actif de la protéine, le docking peut être utilisé pour prédire la structure de la liaison entre la protéine et son ligand. Il permet de prédire l'activité biologiques, optimiser les propriétés physico-chimiques des composés et effectuer des études de relations structure-activité (SAR).

#### 7-1-2 : La préparation des structures de la protéine cible et du ligand:

Cette étape porte sur la correction de la structure, l'ajout des hydrogènes manquants, la protonation appropriée, l'élimination des molécules d'eau non essentielles.

##### a. Préparation de la protéine (Gas) :

Cette étape préliminaire du docking moléculaire, consiste au téléchargement des structures chimiques disponibles via la « Protein Data Bank » (<http://www.pdb.org>) et téléchargés sous forme PDB.

La structure tridimensionnelle de la protéine 6EG8 (Protéine G hétérométrique) a été téléchargée à partir du site Web de la banque de données sur les protéines « RCSB PDB (Protein Data Bank) » <https://www.rcsb.org>, et résolue par RMN. (Wriggers et Schulten ,2011).

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. (Renvez, 2010).

Chaque structure dans la base PDB possède un identifiant unique qui lui est attribué à son dépôt par les administrateurs de la base PDB. Il s'agit d'un identifiant à 4 caractères alphanumériques (le premier caractère étant un chiffre de 1 à 9 et les trois suivants sont des caractères alphanumériques), c'est le « code PDB ». Nous avons utilisé dans notre étude, la protéine G hétérométrique, code 6EG8 (Figure 47).

Les caractéristiques de la protéine G hétérométrique 6EG8, sont données comme suite :

## Partie pratique

---

**Code :** 6EG8

**Structure of the GDP-bound Gs :** heterotrimer

**PDB DOI :** <https://doi.org/10.2210/pdb6EG8/pdb>.

**Classification :** SIGNALING PROTEIN.

**Organisme(s) :** homo sapiens.

**Expression system :** Trichoplusia ni, Escherichia coli.

**Mutation(s) :** yes.

**Membrane proteine :** yes.

**Deposited :**2018-08-19 **Released :**2019-06-05

**Deposition Author(s) :** National institutes of Health/Eunice Kennedy Shriver National institute of child health et human development (NIH/NICHD).

### Experimental Data Snapshot

**Method :**X-RAY DIFFRACTION

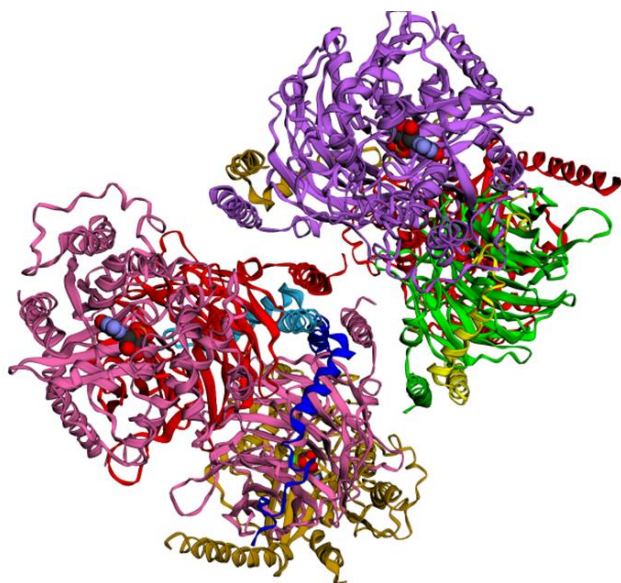
**Resolution :** 2.80Å

**R. Value Free :**0.269

**R. Value Work :**0.217

**R. Value observed :**0.218

**Source :** Structural Insights into the process of GRCP-G Protein Complex Formation, Liu.X, Xu.X, Hilger.D, Aschauer.P, Tiemann.J.K.S, Du.Y, Hirata.K, Sun.X, Guixa-Gonzalez .R, Mathiesen.J.M, Hildebrand.P.W, Kobilka.B.K. ,2019 . Cell 177.1243-1251.e12.



**Figure 47 :** Structure 3D de la protéine G hétérotrimérique (6EG8).

Une fois la protéine 6EG8 téléchargée est exporté dans le logiciel MOE, pour traitement et docking moléculaire.

La structure secondaire de la protéine 6EG8 est donnée par le logiciel MOE, qui va nous permettre de réaliser les opérations suivantes :

La protéine G hétéromérique 6EG8, est formée de trois sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , la présence du ligand original ou de référence fixé à cette protéine en plus de l'ion  $Mg^{2+}$ , et des molécules d'eau.

Nous avons gardé que la sous unité  $\alpha$  pour notre étude, parce qu'elle renferme le site ou la pochette de liaison du GDP /GTP, nous avons éliminé les sous unités  $\beta - \gamma$ , les molécules d'eau pour permettre une meilleure utilisation de la protéine avec un site actif libre lors du docking moléculaire. Le ligand GDP fixé à la sous unité  $\alpha$  est également éliminé.

L'opération suivante consiste à l'ajout des hydrogènes manquants dans la structure 3D de la protéine (Gas), grâce au logiciel MOE.

Nous savons que le téléchargement d'une structure de protéine à partir du PDB (Protein Data Bank) en 3D, ne contient pas les atomes d'hydrogène. Cela est dû en partie au fait que les atomes d'hydrogène sont très petits et difficiles à détecter par les techniques de cristallographie aux rayons X, qui sont souvent utilisées pour déterminer la structure des protéines. De plus, les positions exactes des atomes d'hydrogène dans une protéine peuvent varier considérablement en fonction de facteurs tels que le pH et les interactions avec d'autres molécules, ce qui rend leur inclusion dans une structure cristalline plus difficile.

L'utilisation des programmes informatiques tel que le logiciel MOE, permet de prédire leurs positions en fonction des positions des autres atomes dans la protéine.

Cette étape consiste à l'ajout des atomes d'hydrogènes « reconstruction de l'hydrogène » utile pour la simulation moléculaire.

Egalement, la cristallographie aux rayons X des protéines peut en effet conduire à des cassures de quelques liaisons entre acides aminés. Cela peut se produire pendant le processus de cristallisation, lorsque les protéines sont soumises à des conditions de stress telles que la déshydratation ou la concentration élevée. Les liaisons faibles ou les liaisons labiles peuvent être cassées sous l'effet de ces conditions extrêmes, ce qui peut entraîner des erreurs dans la structure cristalline obtenue. Au cours de la préparation de la protéine, le logiciel MOE grâce à la fonctionnalité « Compute Connected and Type » permet de détecter et de réparer les liaisons covalentes manquantes et les atomes non attribués dans une structure de protéine3D.

Une seule chaîne de la structure 6EG8, la sous unité  $\alpha_s$ , dépourvue des molécules d'eau et du ligand, est sélectionnée pour la préparation de la structure de la cible et enregistrée sous format de fichier mdb. (Molécule data base).

### **b. Préparation des ligands :**

Les ligands qui ont fait de notre étude de docking moléculaire, GDP (Guanosine-diphosphate), GTP (Guanosine-5'-triphosphate) et analogue de GTP non hydrolysable, Guanosine 5'- [ $\gamma$ - thio] triphosphate [GTP $\gamma$ S].

La structure des ligands est obtenue par deux moyens :

- ✓ Le premier : consiste à utiliser des ligands du pdb ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2...) grâce à des logiciels de construction moléculaires.
- ✓ Le deuxième : consiste à utiliser des collections de molécules (chimiothèques) via la base de données PubChem.

La PubChem, est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la National Institute of Health (NIH) (Murray, 2001). La PubChem englobe plusieurs millions de composés mis en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres chimique, biochimique, Pharmacologique, production, toxicologie. etc. :

Les Smiles isomers des ligands GDP, GTP, Analogue non hydrolysable du GTP ont été téléchargés à partir de la base de donnée PubChem.

Les smiles des ligands ont été exportés dans le logiciel MOE pour préparation pour réalisation du docking moléculaire.

La protonation et la minimisation de l'énergie, constitue une étape clé pour la préparation du ligand.

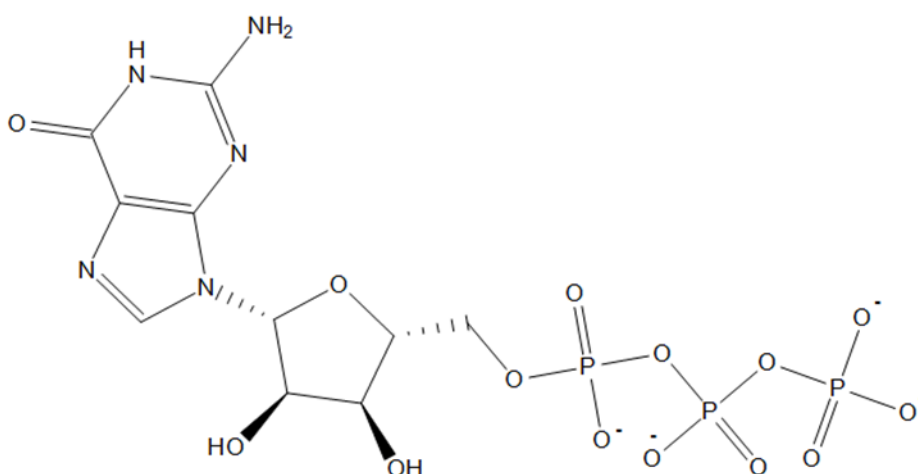
## Partie pratique

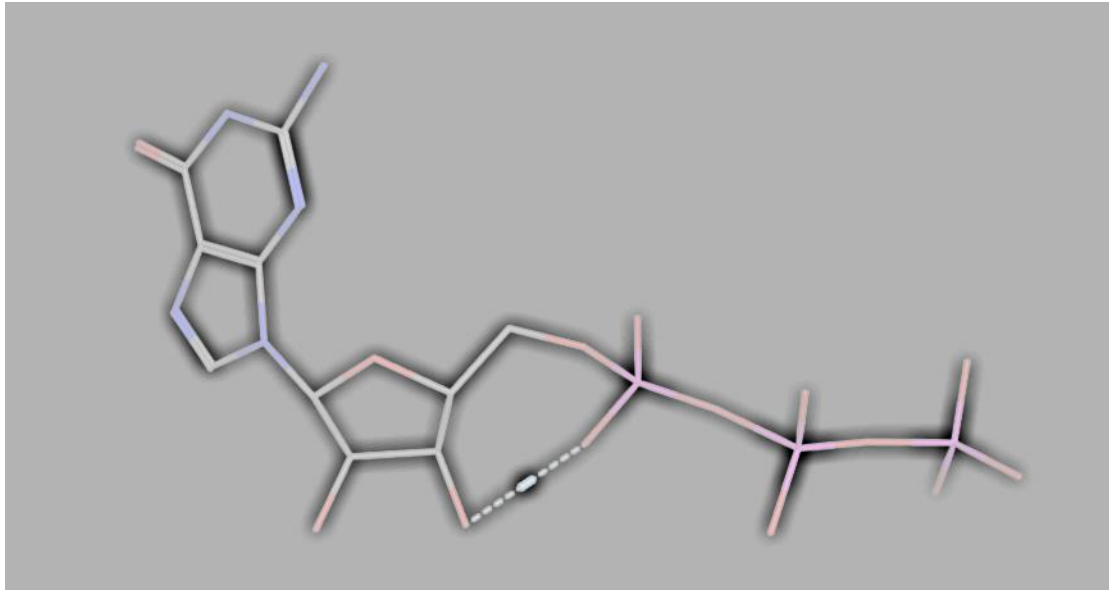
---

Le programme MOE permet la protonation des ligands sélectionnés pour l'étude du docking grâce à la fonctionnalité « protonated 3D », ensuite la minimisation d'énergie du ligand est une étape clé du processus de docking moléculaire car elle permet de trouver la conformation du ligand qui a la plus faible énergie potentielle, c'est-à-dire la conformation la plus stable et la plus favorable pour interagir avec la protéine cible. La minimisation d'énergie consiste à ajuster la géométrie et la conformation du ligand pour trouver une configuration de faible énergie, en utilisant des méthodes de simulation moléculaire telles que la minimisation d'énergie stochastique ou la dynamique moléculaire. Cela permet de générer des poses de ligand plus précises et plus fiables, ce qui est essentiel pour le docking moléculaire.

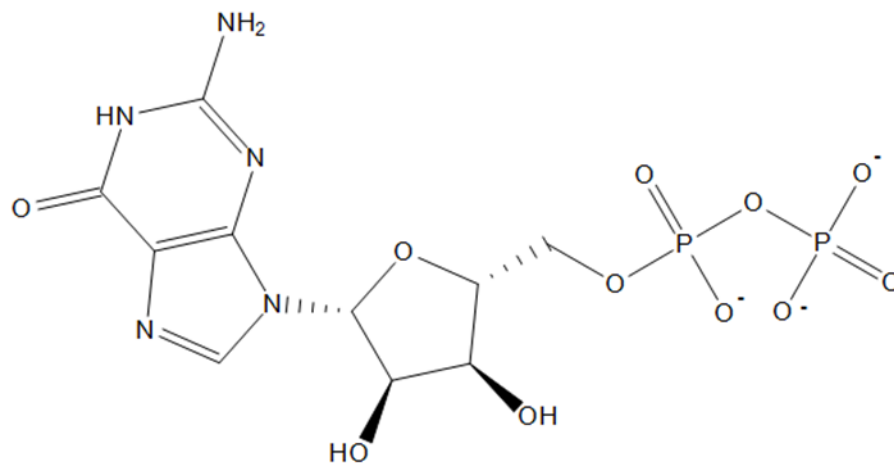
La minimisation d'énergie du ligand est réalisée par le logiciel MOE grâce à la fonctionnalité donnée par ce logiciel « Compute énergie minimize », qui permet d'optimiser la position du ligand pour qu'il se rapproche d'un point minimum en énergie.

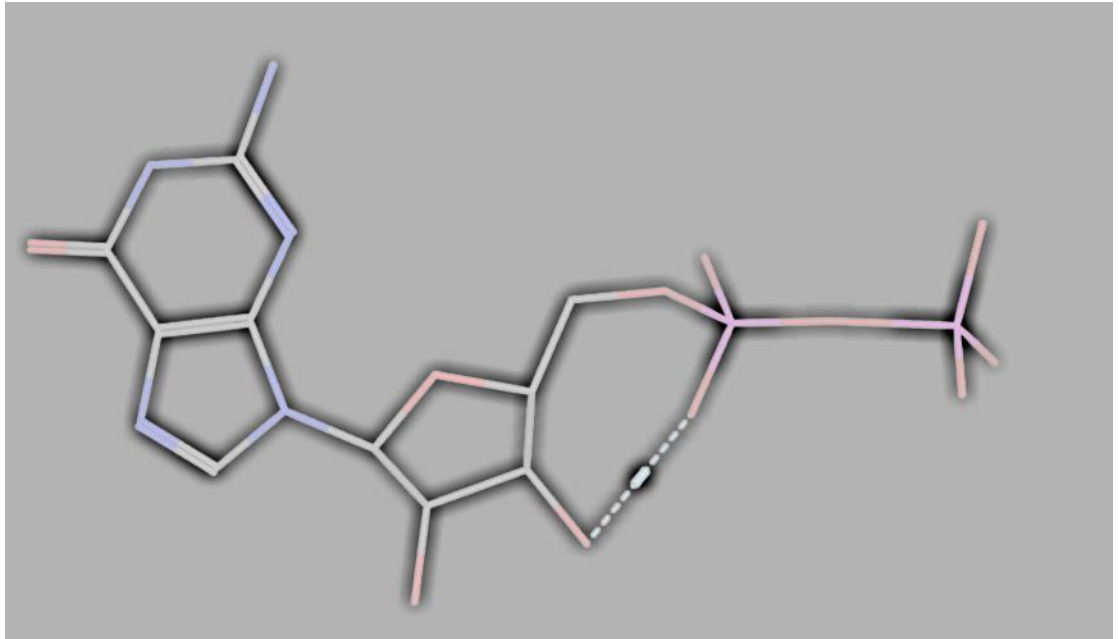
Les ligands préparés sont enregistrés sous format mdb. (Figure 48).



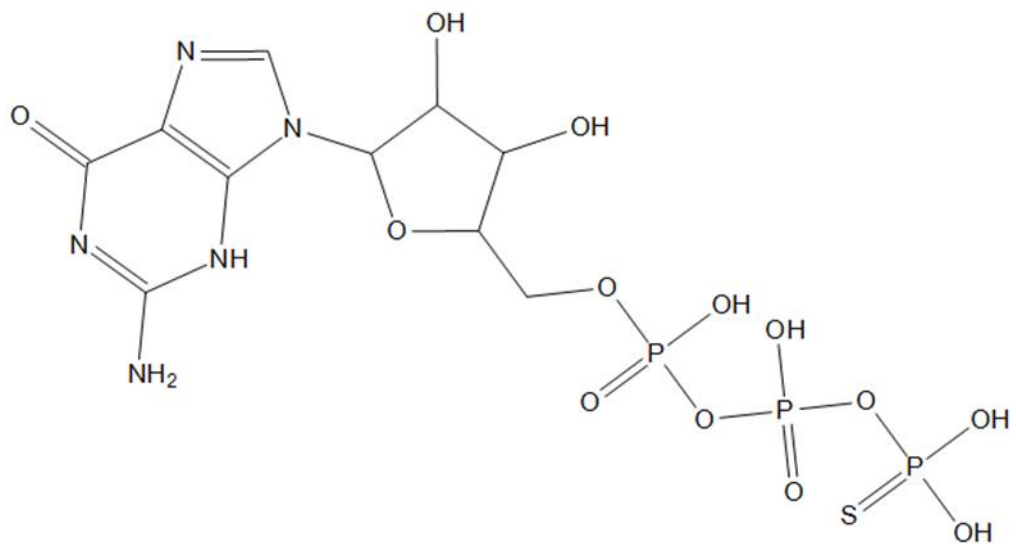


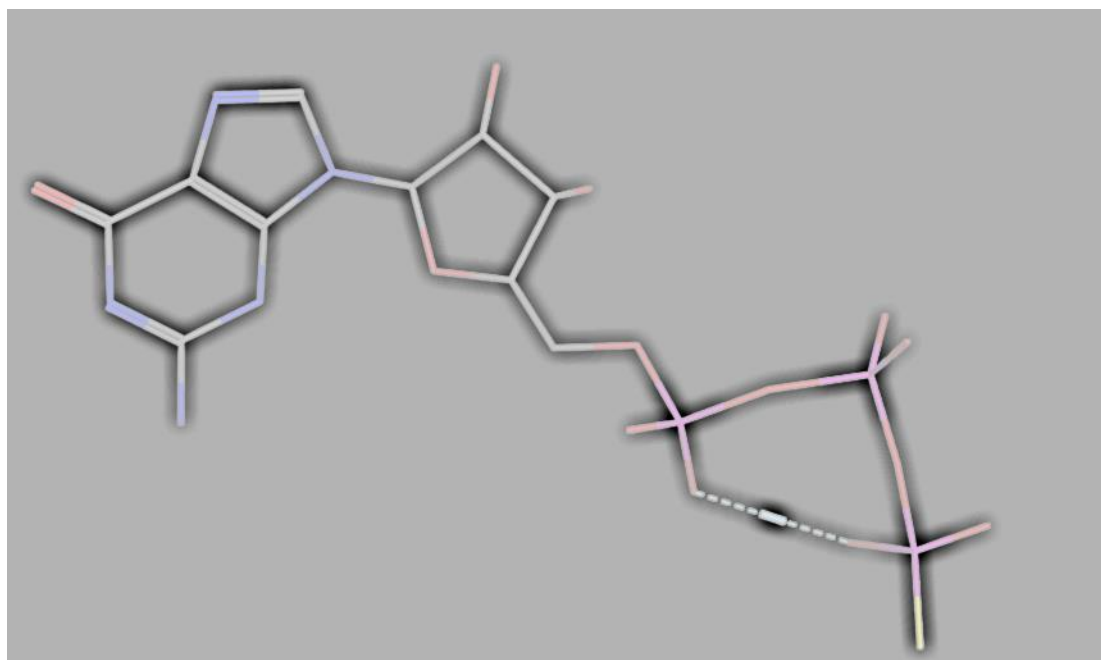
(1) : GTP, (Guanosine-5'-triphosphate).





(2) : **GDP**, (Guanosine-diphosphate).





(3) : analogue du GTP non hydrolysable, Guanosine 5'- [γ- thio] triphosphate [GTPγS]

**Figure 48** : structures chimiques des composés GTP (1), GDP (2) et analogue du GTP non hydrolysable, Guanosine 5'- [γ- thio] triphosphate [GTPγS] (3).

### 7.1.3 Docking moléculaire :

Le logiciel MOE utilise des algorithmes de recherche conformationnelle pour explorer différentes conformations du ligand. Cette étape vise à trouver des conformations favorables qui pourraient se lier étroitement à la protéine cible.

Analyse et évaluation des poses : Les poses (conformations) résultantes du docking sont évaluées et classées en fonction de différents critères tels que l'énergie de liaison prévue, l'ajustement dans la cavité active, les interactions spécifiques avec la protéine cible..

## 7.2. Résultats:

### 7.2.1. Détermination de la séquence primaire de la sous unité αs de la protéine 6EG8 :

La séquence primaire de la sous unité αs de la protéine 6EG8 a été déterminée grâce au logiciel MOE

## Partie pratique

NTerminale

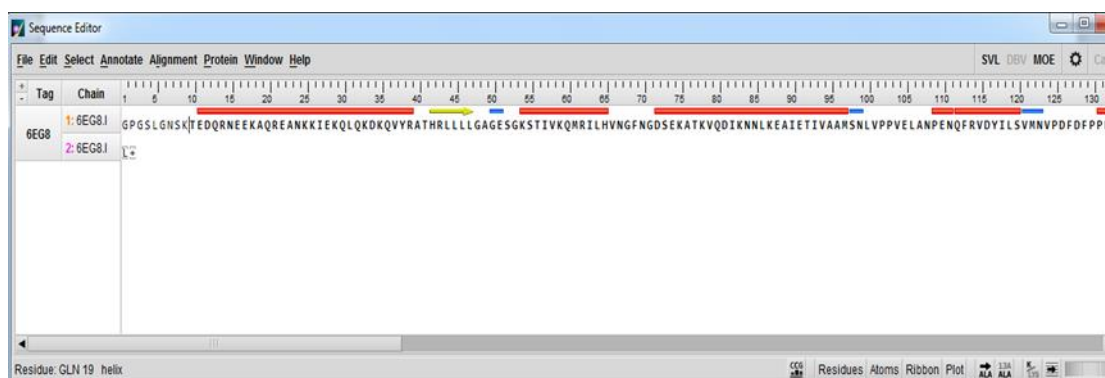
GPGSLENSKTEDQRNEEKAQREANKKIEKQLQKDKQVYRATHRLLLLGAGE  
SGKSTIVKQMRILHVNGFNGDSEKATKVQDIKNNLKEAIETIVAAMSNLVPPV  
ELANPENQFRVDYILSMNVPDFDFPPEFYEHAKALWEDEGVRACYERSNEY  
QLIDCAQYFLDKIDVIKQADYVPSDQDLLRCRVLTSGIFETKFQVDKVNFMF  
DVGGQRDERRKWIQCFNDVTAIIFVVAASSYNMVIREDNOTNRLQEALNLFK  
SIWNNRWLRTISVILFLNKQDLLAEKVLGKSKIEDYFPEFARYTTPEDATPEP  
GEDPRVTRAKYFIRDEFRLISTASGDGRHYCYPHFTCAVDTENIRRVENDCRD  
IIQRMHLRQYELL C terminale.

La sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 est composé de 381 Aa, avec Glycine (Gly) comme extrémité NTerminale et Leucine (Leu) comme C terminale.

### 7.2.2. Caractéristiques de la structure secondaire de la sous unité $\alpha$ s de la protéine 6EG8 :

La structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 est composée de trois chaînes : hélices  $\alpha$  (alpha helix), les feuillets  $\beta$  (beta sheets) et les tours (turns). Les feuillets  $\beta$  Comme dans le cas des hélices  $\alpha$ , il existe plus qu'un seul type de feuillets  $\beta$ , deux catégories suivantes : les feuillets parallèles et les feuillets antiparallèles (figure 49 et 50).

Les tours relient deux structures secondaires qui se suivent dans la chaîne peptidique (deux hélices  $\alpha$ ) ou relient entre eux deux brins du même feuillet  $\beta$  (les deux brins pouvant cependant ne pas être adjacents dans les feuillets). Les caractéristiques structurales secondaire ont été visualisées grâce au logiciel MOE (figure 49 et 50)



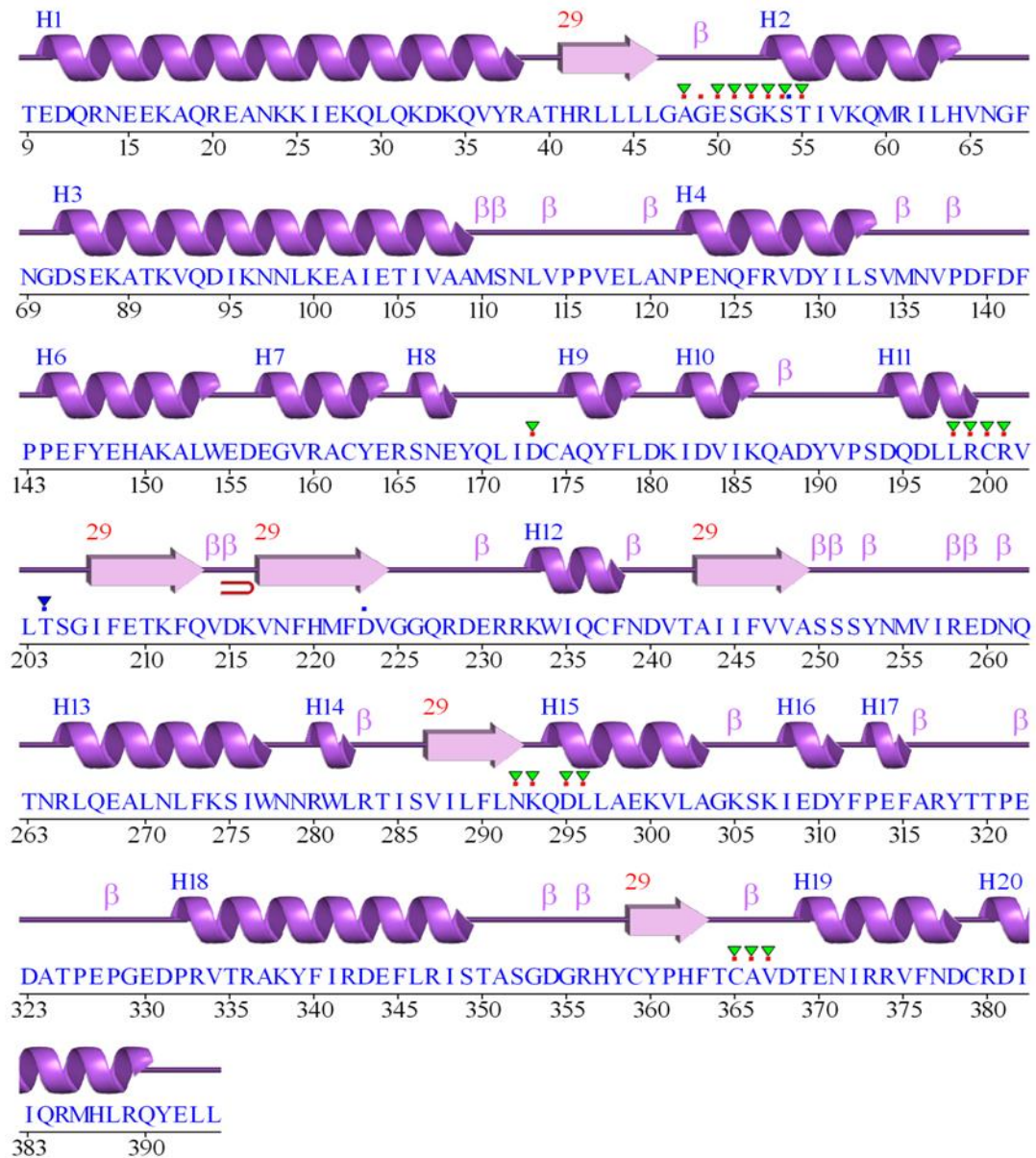
**Figure 49** : Téléchargement de la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 (logiciel MOE).

**Rouge** : Hélice alpha de la sous unité  $\alpha$ s.

**Jaune** : chaînes  $\beta$  de la sous unité  $\alpha$ s.


**Bleu** : coudes de la sous unité  $\alpha$ s.

## Partie pratique



### Key :

Sec. Struc :  Helices labelled H1,H2,... and strands by their sheets A,B,...

Motifs :  $\beta$  beta turn  beta hairpin

Residue contacts :  to ligand  to metal

PDB SITE records :  AC1  AC2  AC3  AC4

 AC5  AC6  AC7  AC8

**Figure 50** : Structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 (pdb sum).

## Partie pratique

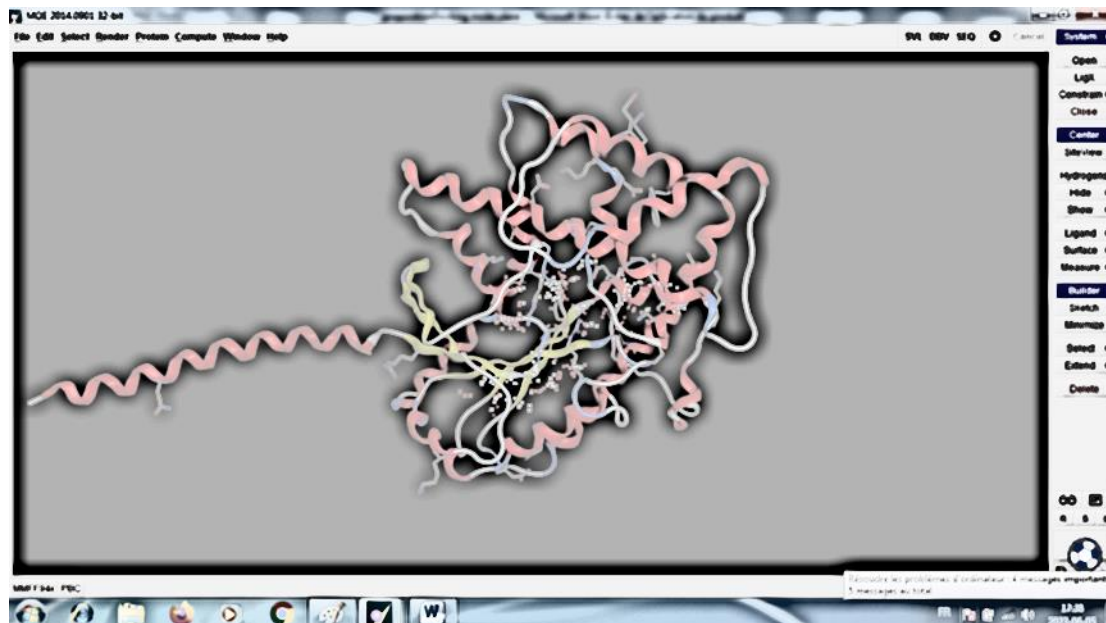
La composition en acides aminés des différents composants de la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8 (tableau 1) D'après les résultats obtenus par le MOE, la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s est composée de 20 d'hélices  $\alpha$ , 5 chaînes  $\beta$  parallèles et 3 antiparallèles, 20 coudes qui relie les chaînes  $\beta$ .

**Tableau 1** : La composition de la structure secondaire de la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8.

Structure cristallographiques	Hélice alpha	Feuillets beta parallèles	Feuillets beta anti parallèles	coudes
<b>6EG8</b>	GLU10-ARG38	HIS41 -LEU64	ILE207-VAL214	GLU49 -GLU50
	LYS53 -HIS64	PHE219-ASP223	VAL217-ASN218	SER111- ASN112
	ASP71 -MET110	ALA243 -ALA249	VAL224	VAL134 -ASN136
	PRO122 -ASN124	VAL287 ASN292		GLU155
	GLN125- SER133	CYS359 -PHE363		ARG165
	PRO144- TRP154			ASP173- CYS174
	GLU157 -GLU164			ASP180- LYS181
	SER166- GLU168			ALA188- ASP189
	ALA175 -LEU179			ASP215- LYS216
	ILE182- LYS186			ASN239- ASP240
	ASP194- ARG199			SER250- SER251
	LYS233- PHE238			TYR253- ASN254
	ARG265- TRP277			ARG258 -ASP260
	ARG280- LEU282			ASN278
	GLN294- ALA303			PRO328 -GLU329
	ILE308 -TYR311			THR350- ALA351
	PRO313- PHE315			ASP354- GLU355
	PRO332 -SER349			ALA366- VAL367
	THR369- ASP378			CYS379
	ARG380- GLN390			TYR391 -GLU392

### 7.2.3. Visualisation des interactions de sous unité $\alpha$ de la 6EG8 avec les ligands dockés :

La sous unité  $\alpha$  préparée grâce au logiciel MOE pour docking moléculaire (figure 51)



**Figure 51** : Représentation en 3D de la sous unité  $\alpha$  de la protéine 6EG8 préparée grâce au logiciel MOE pour docking moléculaire .

Les résultats de l'amarrage sont résumés dans le tableau 2. Le docking moléculaire par MOE permet de classer les dix (10) poses ou conformations en fonction de leurs scores ou l'affinité (S ou  $\Delta G$ ) de chaque ligand au sein du site actif étudié (tableau 2).

## Partie pratique

---

**Tableau 2** : classement des poses des ligands dockés. **Mol** : ligand

**Rseq**: nombre de récepteur

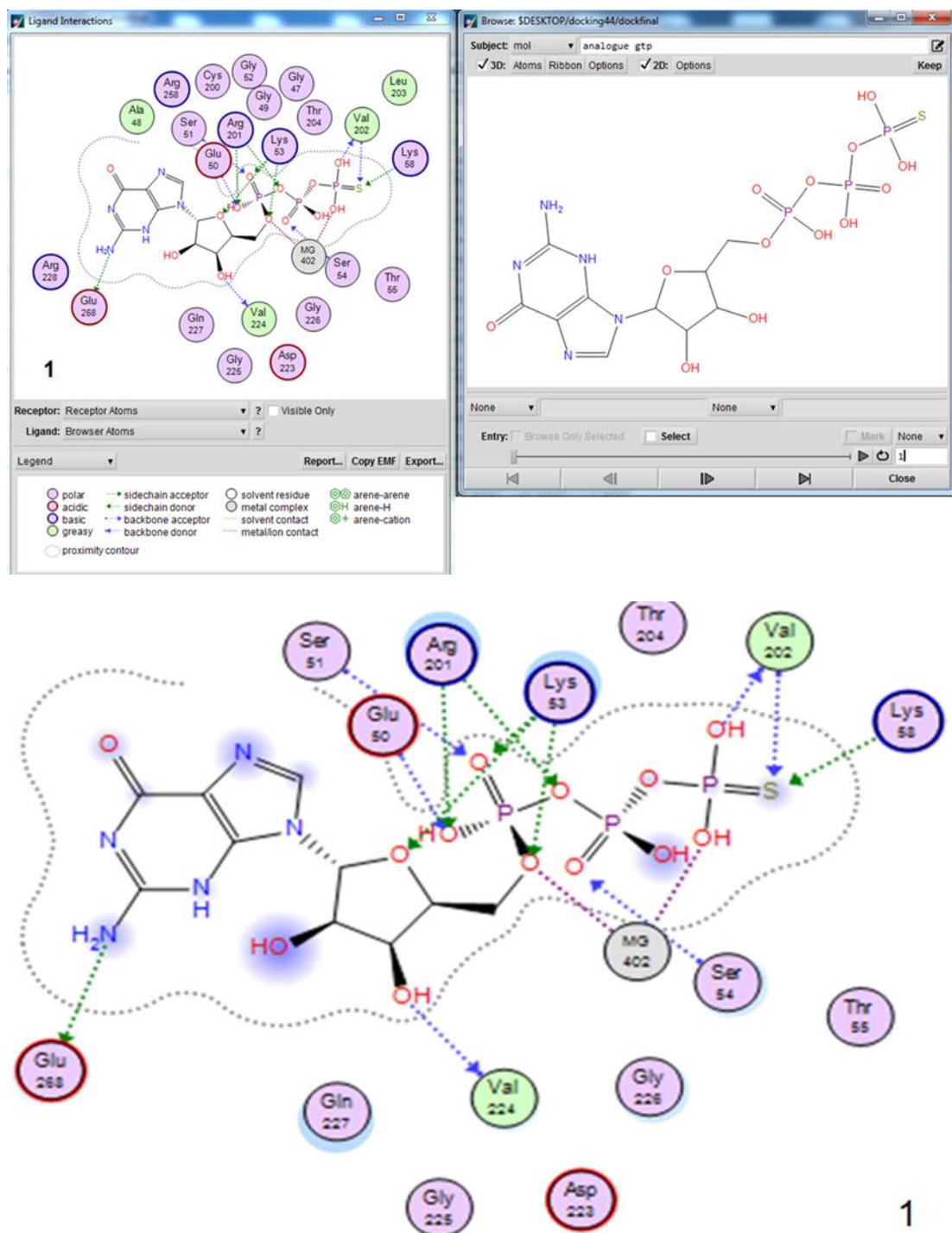
**Mseq**: numéro du ligand

**S**: variation d'énergie libre de liaison ( $\Delta G$ ), exprimé en Kcal/mol

	<b>Mol</b>	<b>Rseq</b>	<b>Mseq</b>	<b>S ( Kcal/mol)</b>
<b>1</b>	<b>Analogue gtp</b>	1	1	_14 ,6644
<b>11</b>	<b>Gtp</b>	1	2	_9 ,5571
<b>14</b>	<b>Gdp</b>	1	3	_8,9847
<b>53</b>	<b>Gdp</b>	1	3	7,2041
<b>57</b>	<b>Gtp</b>	1	2	11,6852
<b>59</b>	<b>Analogue gtp</b>	1	1	47,3413

L'interprétation des résultats de docking peut être effectuée à l'aide de visualisations 2D. La visualisation en 2D permet de comprendre la position des résidus de la protéine qui sont en contact avec le ligand et la nature des interactions chimiques spécifiques entre la protéine et le ligand.

En ce qui concerne, la représentation en 2D de l'interaction de l'analogue du GTP non hydrolysable, le Guanosine 5'-[ $\gamma$ - thio] triphosphate (  $GTP\gamma S$  ), avec la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 ( figure 51).



**Figure 52 :** Représentation en 2D des différentes interactions de Guanosine 5'-[ $\gamma$ -thio] triphosphate (GTP $\gamma$ S) et sous unité  $\alpha$  de la protéine 6EG8 .

**Légende :**

Bleu : interaction de type Van der Waals.

Vert : interaction de type hydrogène.

Move : interaction hydrophobe.

Interactions hydrophobiques de type  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles benzéniques de ligand et les acides aminés (à l'intérieur de cycle benzène et Aa).

## **Partie pratique**

---

### **Guanine :**

Interaction de type hydrogène entre la guanine de 5'GTP $\gamma$ S et Glu268 (E) de la sous unité  $\alpha$ s.

### **Base ribose :**

Interaction de type Van Der Waals entre ribose 5'GTP $\gamma$ S et Val 224 de la sous unité  $\alpha$ s.

Interaction de type hydrogène entre 5'GTP $\gamma$ S ribose et Lys 52 de la sous unité  $\alpha$ s.

### **Phosphate $\alpha$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\alpha$  de 5'GTP $\gamma$ S et Glu 50, Ser 51 de la sous unité  $\alpha$ s.

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\alpha$  et Arg 201(R), Lys 53 de la sous unité  $\alpha$ s.

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\alpha$  et Mg 402 de la sous unité  $\alpha$ s.

### **Phosphate $\beta$ :**

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\beta$  et Arg 201

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\beta$  et Ser 54

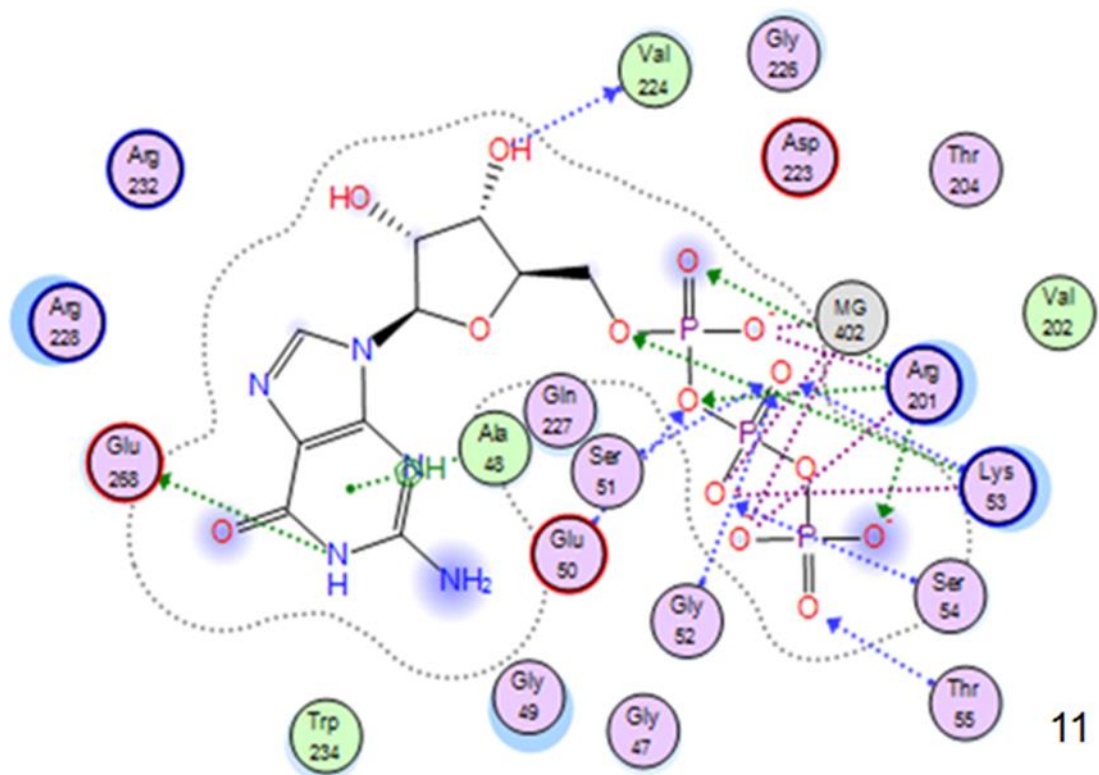
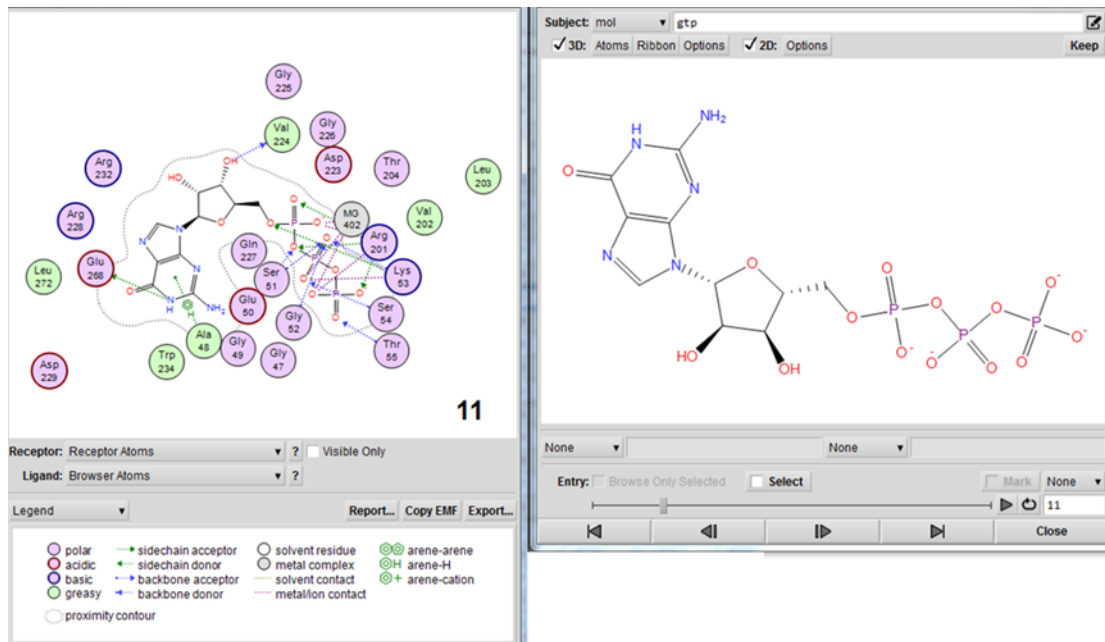
### **Phosphate $\gamma$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\gamma$  et Val 202

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\gamma$  et Lys 58

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\gamma$  et Mg 402.

La représentation en 2D de l'interaction du GTP , avec la sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 ( figure 53).



**Figure 53 :** Representation en 2D des différentes interactions de GTP–sous unité  $\alpha$  de la protéine 6EG8.

## **Partie pratique**

---

### **Guanine :**

Interaction de type hydrogène entre la guanine du GTP et Glu268

Interactions d'hydrogènes de type  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle de la guanine du GTP et Ala48 de la sous unité  $\alpha$ s.

### **Base ribose :**

Interaction de type Van Der Waals entre ribose de GTP et Val224 de la sous unité  $\alpha$ s

### **Phosphate $\alpha$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\alpha$  de GTP, Glu50 de la sous unité  $\alpha$ s.

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\alpha$  et Arg201, Lys53 et Mg402

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\alpha$  et Arg201, Mg402

### **Phosphate $\beta$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\beta$  et Ser54, Ser51, Lys53, Gly52

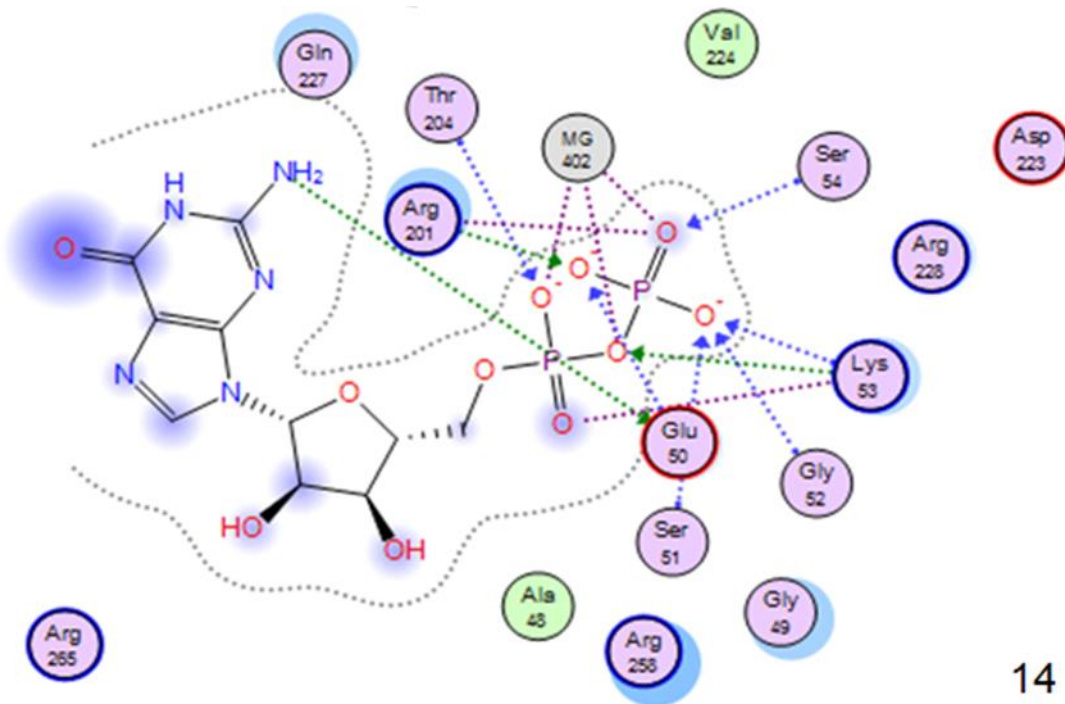
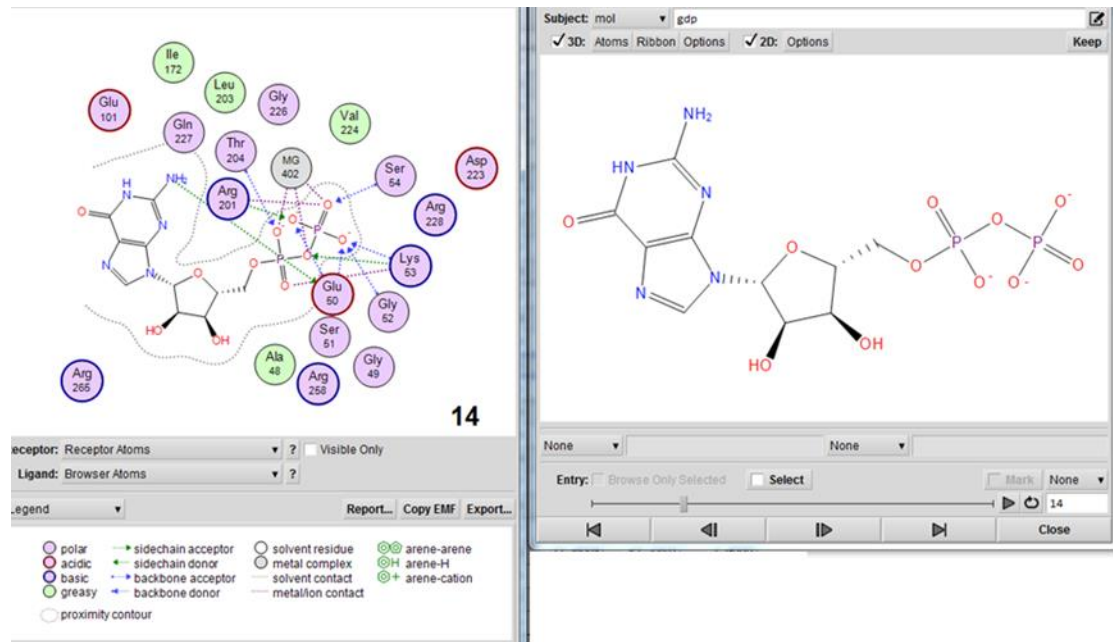
Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\beta$  et Lys53, Mg402

### **Phosphate $\gamma$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\alpha$  et Thr55

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\alpha$  et Arg201

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\alpha$  Mg402, Arg201



**Figure 54 :** Représentation en 2D des différentes interactions de GDP–sous unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8.

### **Guanine :**

Interaction de type hydrogène entre Guanine du GDP et Glu50 .

### **Phosphate $\alpha$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\alpha$  et Thr204.

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\alpha$  et Lys 53

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\alpha$  et Lys53, Mg402

### **Phosphate $\beta$ :**

Interaction de type Van Der Waals entre Phosphate  $\beta$  et Ser54 ,Lys53, Gly52, Ser51 ,Glu50.

Interaction de type hydrogène entre Phosphate  $\beta$  et Arg201

Interaction de type hydrophobe entre Phosphate  $\beta$  et Arg201, Mg402

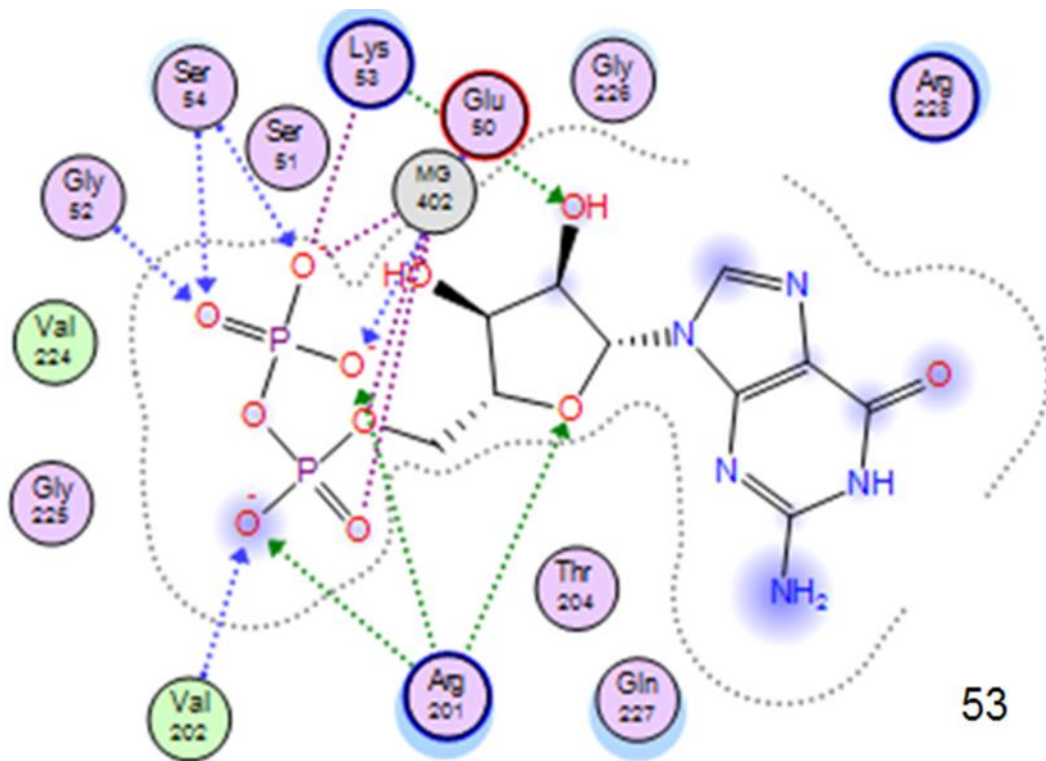
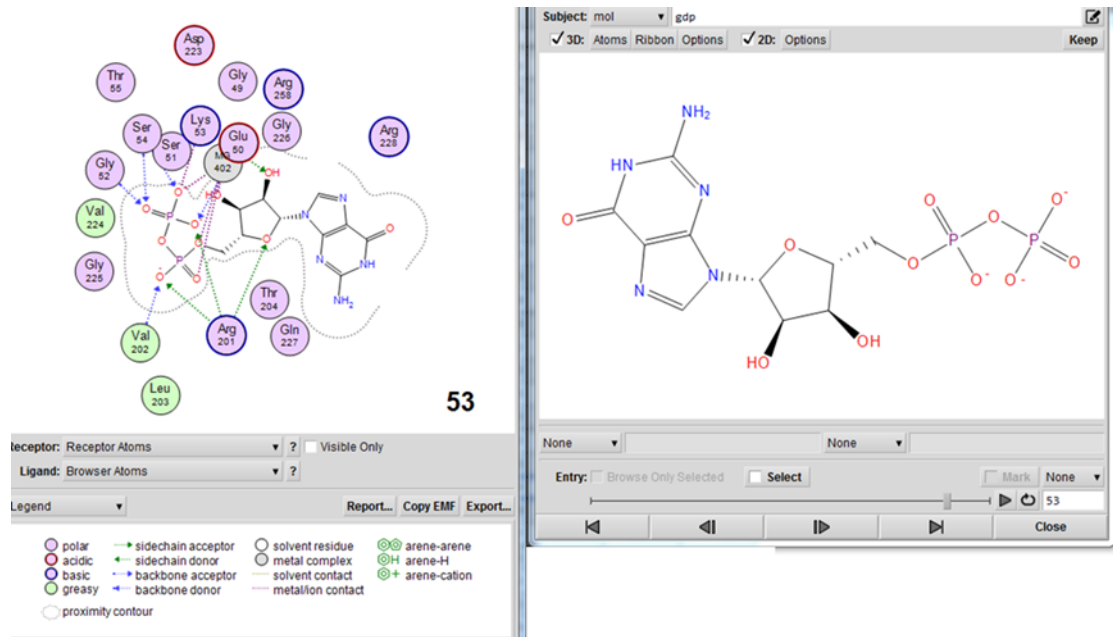


Figure 55 : Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du GDP avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.

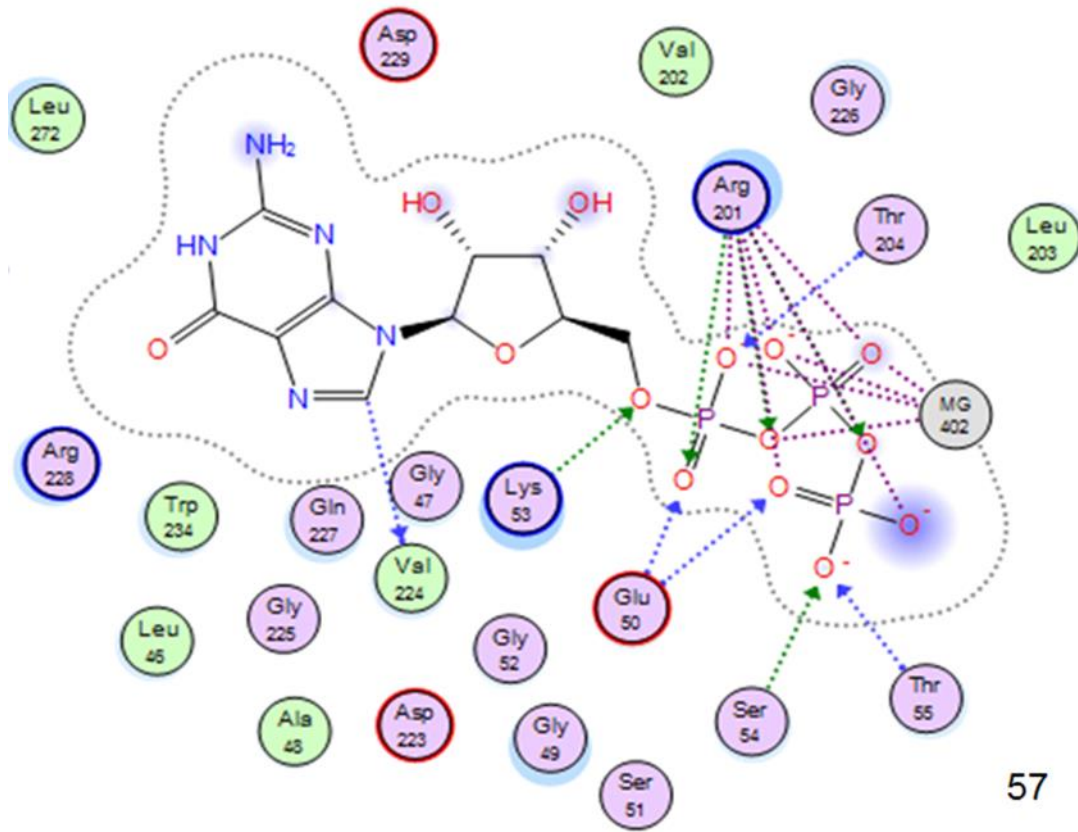
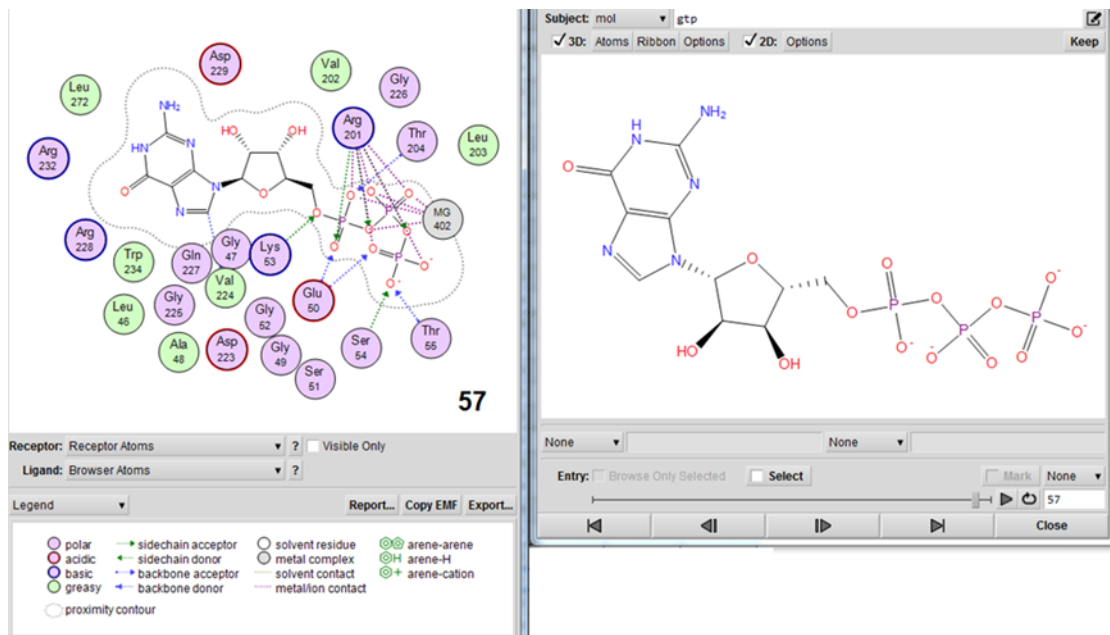
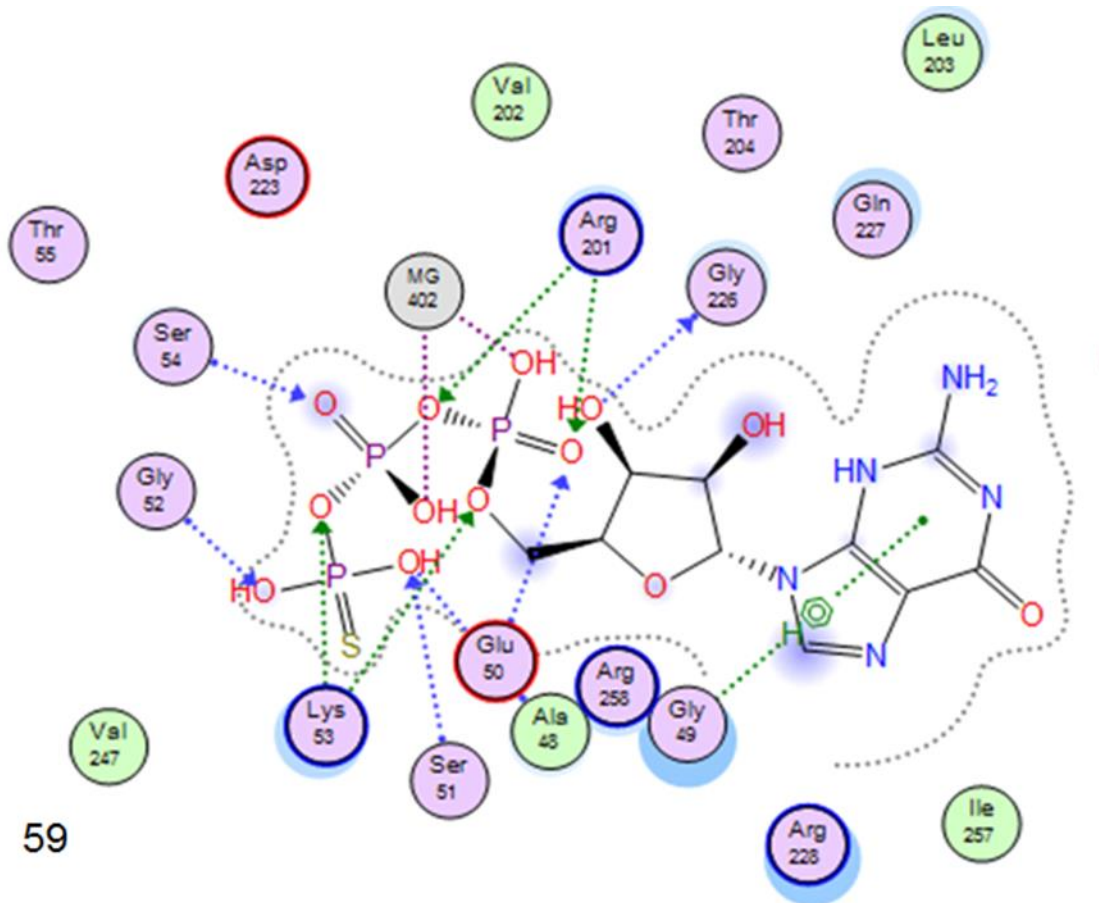
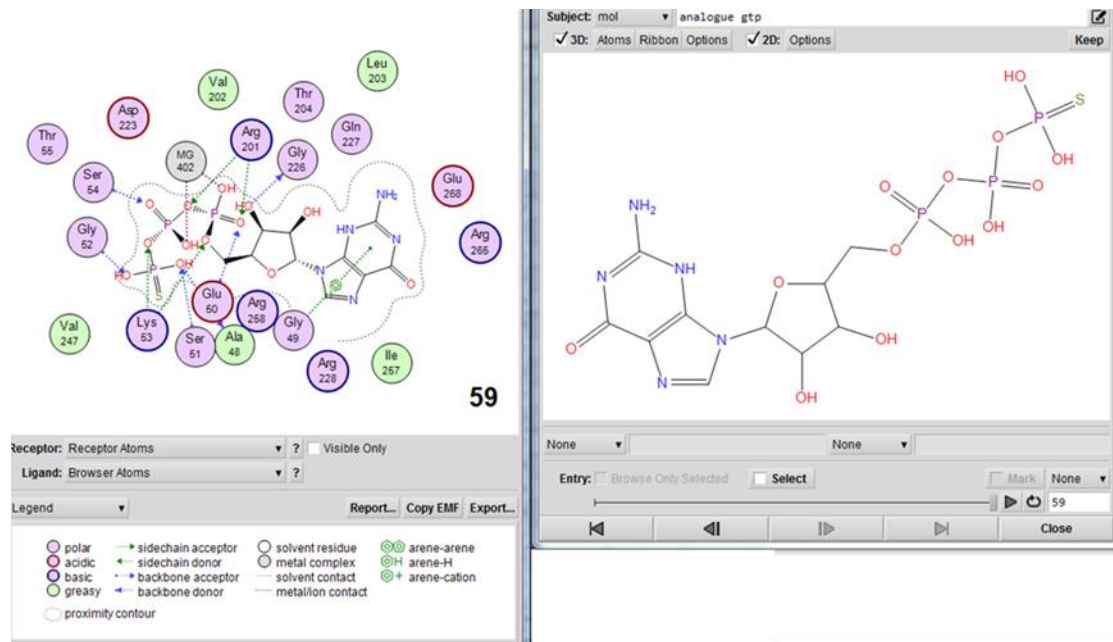
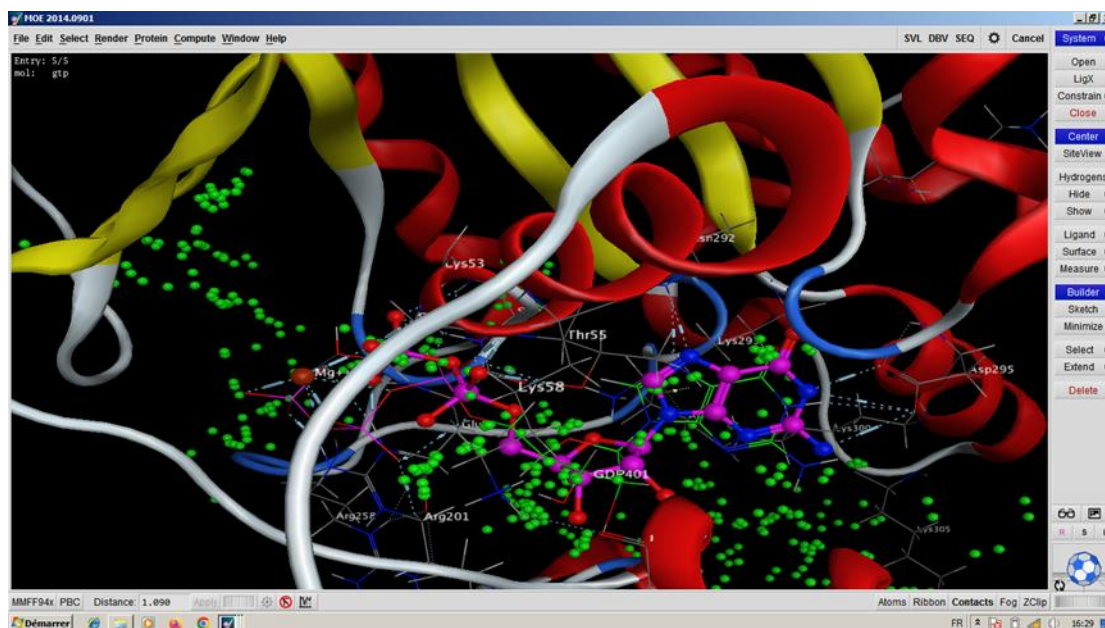


Figure 56 : Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du GTP avec la sous unité  $\alpha$  de la 6EG8.



**Figure 57 :** Interaction entre la 10<sup>ème</sup> pose du 5'GTPyS avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.



**Figure 58 :** Visualisation en 3d du docking final par le logiciel MOE.

### 7.3. Discussion :

La sous-unité  $\alpha$  de la protéine G contient généralement des acides aminés spécifiques qui interagissent avec le GDP. Cette région peut varier légèrement en fonction du type de protéine G et de l'organisme, mais certaines caractéristiques générales sont observées. La sous-unité  $\alpha$ s de la protéine G possède généralement un domaine appelé « domaine de liaison au nucléotide » qui interagit directement avec le GDP. Ce domaine comprend des acides aminés conservés qui participent à la liaison et à l'hydrolyse du GDP (Suzuki et al., 2003).

L'analyse d'amarrage moléculaire ou le docking moléculaire est une méthode fiable pour l'évaluation de l'affinité de liaison (ligand – récepteur) et la prédiction des interactions intermoléculaires de nouveaux composés à haut potentiel d'affinité pour les récepteurs. (Scott et al., 2016).

D'après les résultats obtenus par le logiciel MOE, la sous-unité  $\alpha$ s de la protéine 6EG8 est composée de 381 acides aminés avec Glycine comme extrémité Nterminale et Leucine comme extrémité Cterminale (figure 49). Cette sous-unité  $\alpha$  est composée de 20 chaînes hélices  $\alpha$ , 5 chaînes  $\beta$  chaînes parallèles, 3 chaînes  $\beta$  antiparallèles et 20 coudes reliant les chaînes  $\beta$  (tableau 1).

Le Docking moléculaire réalisé nous a permis de comprendre la nature des interactions entre la sous-unité  $\alpha$ s de la protéine G hétérotrimérique (6EG8) avec les ligands GDP, GTPet analogue non hydrolysable (5'GTP $\gamma$ S) dont le but est d'identifier la nature du site de liaison GTPasique et de sélectionner les ligands à haut potentiel d'interaction avec le récepteur.

## Partie pratique

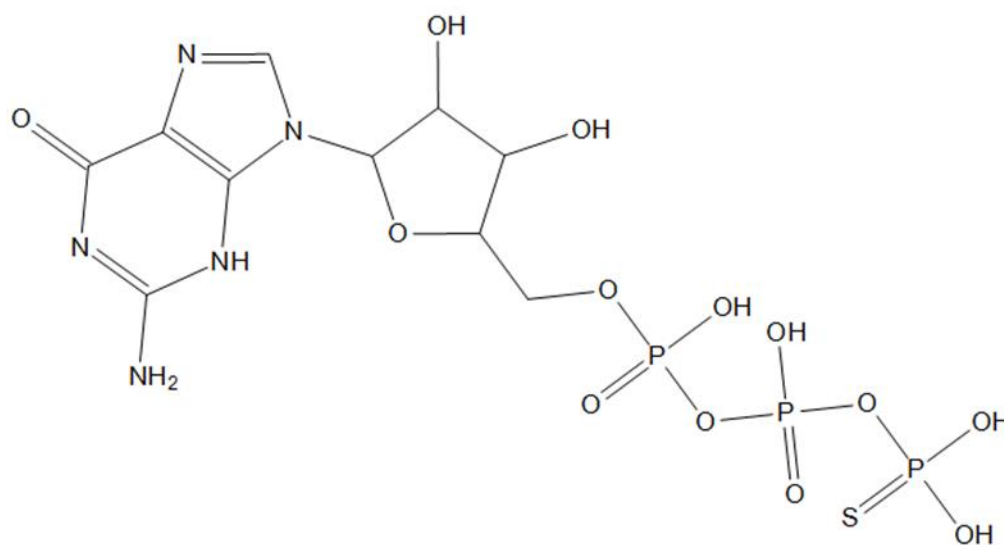
---

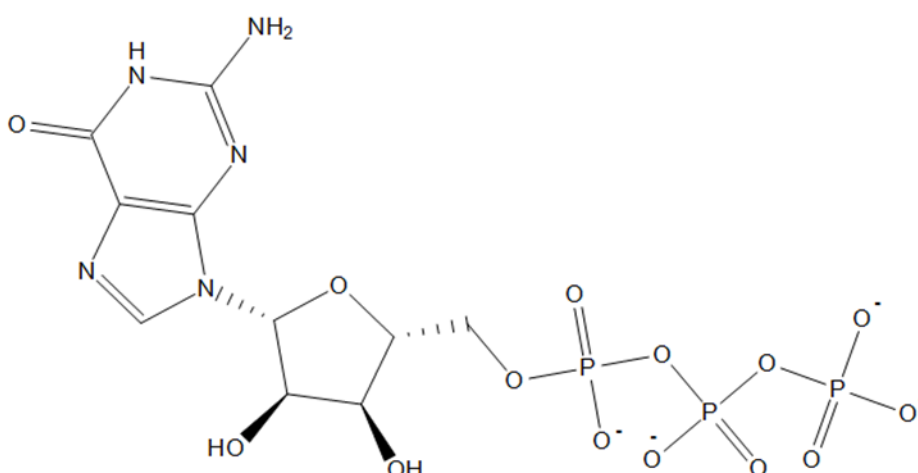
Lorsque le docking est effectué, un grand nombre de structures protéine-ligand différentes sont générées par le logiciel MOE, chacune étant évaluée en fonction de la probabilité qu'elle représente une interaction la plus probable ou favorable.

Dix poses (10 conformations) réalisés par le logiciel MOE ont été sélectionnés pour chaque ligand et classés en fonction des affinités des ligands dans le site actif de la protéine, et pour sélectionner la pose la plus probable et la plus stable.

Les résultats du docking des différentes poses, ont révélé que la sous unité  $\alpha$  peut établir des liaisons non covalentes avec les trois ligands étudiés (GTP, 5'GTP $\gamma$ S, GDP).

L'analogue du GTP non hydrolysable (5'GTP $\gamma$ S) a présenté la meilleure pose avec un score de liaison de -14.644 kcal/mol suivie du GTP avec -9.5571 kcal/mol et du GDP -8.9847 kcal/mol ( tableau 2 ). Cette forte affinité de l'analogue non hydrolysable du GTP, le 5'GTP $\gamma$ S comparée au GTP est due à la liaison entre le groupe phosphate terminal et le reste de la molécule est une liaison thioester. Dans cette liaison, le soufre est lié au phosphore. La liaison thioester est généralement plus stable que la liaison ester, ce qui empêche l'hydrolyse de la molécule (figure59).





**Figure59** : Structure du GTP et du 5GTP $\gamma$ S.

La visualisation des résultats du docking en 2D montre que le ligand 5GTP $\gamma$ S établit avec le site actif de sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8, plusieurs interactions avec les acides aminés avec un score -14,6644 Kcal/mol.

De type VDW avec les acides aminés : Val 224 Glu 50, Ser 51 Ser 54 Val 202

De type hydrophobe avec le Mg 402

De type hydrogènes avec les acides aminés : acide aminé numéro Glu268 , Lys 52 Arg 201, Lys 58 ( tableau 1 )

**Le GTP** avec un score de liaison inférieur a celle de l'analogue 5GTP $\gamma$ S , est de - 9.5571 kcal/mol , établit avec le site actif de sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8 ,plusieurs interactions avec les acides aminés: de type VDW avec les acides aminés : Val224 Glu50 Ser54, Ser51, Lys53, Gly52 Thr55 ,De type hydrogènes avec les acides aminés :Glu268 Arg201, Lys53 et Mg402 Arg201 et Interactions d'hydrogènes de type  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle de la guanine du GTP et Ala48 de la sous unité  $\alpha$ s. et des interactions hydrophobiques avec Arg201, Mg402 Lys53. ( tableau 1)

Le GDP avec un score de liaison de .8,9847 kcal/mol , établit avec le site actif de sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8 ,plusieurs interactions avec les acides aminés de type VDW avec les acides aminés : Thr204. Ser54 ,Lys53, Gly52, Ser51,Glu50.

De type hydrogènes avec les acides aminés : Glu50 Lys 53 Arg201

et des interactions hydrophobiques avec Arg201, Mg402 Lys53, Mg402

Les acides aminés clés dans le motif de liaison G sont présentés dans le tableau 3.

## Partie pratique

Il est a noté que les trois ligands sélectionnés pour le docking moléculaire sont :

**Analogue GTP** : Glu 50, Ser 51, Lys 53, Ser 54, Lys 58, Arg 201, Val 202, Val224, Glu268.

**GTP** : Ala48, Glu50, Ser51, Gly52, Lys 53, Ser54, Thr55, Arg 201, Val224, Glu268.

**GDP** : Glu50, Ser51, Gly52, Lys 53, Ser54, Arg201, Thr204, Mg402 (tableau 3)

**Tableau 3** : Tableau récapitulatif des interactions avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8.

Ligand	Guanine	ribose	Phosphate	Mg <sup>2+</sup>
<b>Analogue GTP</b>	Glu268 (E).	Val224 (V). Lys53 (K).	<b>P<math>\alpha</math></b> : Glu 50(E), Ser 51(S), Arg 201(R), Lys 53(K), Mg 402 <b>P<math>\beta</math></b> : Arg 201(R), Ser 54(S). <b>P<math>\gamma</math></b> : Val 202(V), Lys 58 (K) Mg 402	Avec phosphate $\alpha$ phosphate $\gamma$
<b>GTP</b>	Glu268(E) Ala48 (A).	Val224(V)	<b>P<math>\alpha</math></b> : Mg 402, Arg 201(R) Glu50(E), Lys 53 (K). <b>P<math>\beta</math></b> : Ser51(S), Lys53(K), Gly52(G), Mg 402, Ser54(S) <b>P<math>\gamma</math></b> : Thr55(T), Arg201(R), Mg 402	Avec phosphate $\alpha$ , phosphate $\beta$ Phosphate $\gamma$
<b>GDP</b>	Glu50(E)		<b>P<math>\alpha</math></b> : Thr204(T). Mg 402 Lys 53(K) <b>P<math>\beta</math></b> : Ser54(S), Lys53(K), Gly52(G), Ser51(S),Glu50(E),Arg201(R), Mg402	Avec phosphate $\alpha$ , phosphate $\beta$

### Il est a noté suite :

Les acides aminés en commun entre les deux nucléotides et guanine sont : Glu268, Ala48 et Glu50.

Ribose : Val224, Lys53

Phosphate  $\alpha$  : Glu 50(E), Ser 51(S), Arg 201(R), Lys 53(K), Thr204(T). Lys 53(K)

Phosphate  $\beta$  : Ser54(S), Lys53(K), Gly52(G), Ser51(S), Arg 201(R),

Phosphate  $\gamma$  avec Val 202(V), Lys 58 (K), Thr55(T), Arg201(R),

La présence du magnésium est essentielle pour des nombreuses réactions biochimiques impliquant le GTP, notamment dans la signalisation cellulaire régulée par les protéines G. Le magnésium joue un rôle crucial dans le site GTPasique de la protéine G se lie aux groupes phosphates du GTP dans le site GTPasique de la protéine G .(Smith et Gestwicki,2012)

Les résultats présentés dans tableau 3, montrent les différentes coordinations de l'ion  $Mg^{2+}$ . L'ion  $Mg^{2+}$ , un cation divalent chargé positivement. En raison de cette charge positive, il peut former des liaisons avec les groupes phosphates du GTP qui sont chargés négativement.

Les résultats du docking des trois ligands avec la sous unité  $\alpha$ s de la 6EG8, le  $Mg^{2+}$  se lie aux groupements phosphate  $\alpha$  et  $\gamma$  (5'GAMA), au phosphate  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ( GTP) et au phosphate  $\alpha$  et  $\beta$  du GDP. Cette coordination des ions phosphates par le magnésium facilite l'hydrolyse du GTP en GDP et Pi. Il stabilise la transition conformationnelle de l'état actif à l'état inactif de la protéine G et agit comme un cofacteur pour l'activité GTPasique. Ces processus sont essentiels pour réguler la signalisation cellulaire contrôlée par les protéines G (Gheyouche ;2020).

Des travaux récents portant sur la structure du site de liaison au GDP /GTP des protéines monomériques comme les Rab GTP ases.

Les Rab GTPases sont des protéines de faible poids moléculaire (d'environ 21 kDa à 25 kDa) dont la structure comprend une pochette de liaison au GDP/GTP très conservée. Elles sont formées de cinq motifs appelés G1 à G5 codant pour différentes séquences consensus essentielles pour la liaison du GDP/GTP (Schmoll et al., 2016)

Le domaine G, qui caractérise la plupart des GTPases, forme le site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides ou mononucleotide-binding domain (WOLF et al., 1999, Paduch et al., 2001) .Le domaine G est responsable de changements de conformation dépendant des nucléotides : il agit comme un commutateur moléculaire (switch) entre l'état désactivé lié au GDP et l'état activé lié au GTP.

Ce domaine G (165 acides aminés) se compose de 5 domaines ou boxes qui sont impliqués dans la liaison avec la guanine et l'ion  $Mg^{++}$ (Wennerberg,2005 ; Buchsbaum, 2007), figure 60et 61.

Le domaine G1, aussi appelée motif Walker A, est responsable de l'interaction avec l' $\alpha$ -et le  $\beta$ -phosphate du nucléotide via le groupement amide de la chaîne principale en formant une boucle grâce à ses glycines conservées d'où l'appellation P-loop, en raison de son rôle pivot dans la coordination du  $\beta$ -phosphate du nucléotide lié car sert de point d'ancrage du nucléotide. Sa séquence consensus  $GX_1X_2X_3X_4GK[T/S]$  est un motif de Walker de type A (Walker et al., 1982), contient une lysine qui stabilise (Bourne et al., 1991, Vetter, 2014; Schaefer et al., 2014; Cherfils et Zeghouf, 2013), figure 60

Les atomes d'azote de la chaîne principale interagissent étroitement avec les phosphates chargés négativement.

Boucle P (P-loop) de G1 La lysine (K), cruciale pour la liaison au nucléotide, interagit directement avec les oxygènes des phosphate  $\beta$  du GDP (et GTP) et du phosphate  $\gamma$  terminal du GTP.

Le groupe hydroxyle (-OH) de la sérine (S) (S) ou la thréonine (T) contacte l'oxygène du phosphate  $\beta$  et l'ion  $Mg^{++}$  (Bourne et al., 1991, Vetter, 2014)

La région Switch I (G2) interagit avec le magnésium ( $Mg^{2+}$ ), ion important pour la stabilité de l'interaction de la GTPase avec le nucléotide.

Le domaine G2 comporte le Switch I (32-38), un des interrupteurs, région qui change de conformation lors de l'échange GDP/GTP. Le domaine G2 contient la Thr35 (dans H-Ras) qui se lie au  $\gamma$  phosphate terminal du GTP et au  $Mg^{++}$ . Cette thréonine (T) jouerait un rôle dans l'orientation de la boucle qui porte le motif B de Walker (G3) et interviendrait dans la coordination de l'ion magnésium catalytique, mais également dans l'interaction avec les effecteurs (Bourne et al., 1991, VETTER, 2014). Le motif de Walker B (domaine G3) ou Switch II, contient le motif  $DX_1X_2G$  (57-60), interagit avec l'ion magnésium pour la stabilité, mais lie également le  $\gamma$ -phosphate lors de liaison du GTP (Walker et al., 1982). Ce motif est flexible et change de conformation en fonction de la nature du nucléotide fixé (Bourne et al., 1991, Vetter, 2014). L'acide aspartique, Asp57, conservé intervient dans la fixation du magnésium catalytique via une molécule d'eau. L'acide glutamique, Glu60, dans Switch II (résidues 59-67 chez H-Ras) activerait l'hydrolyse de GTP en GDP, via une liaison hydrogène avec l'oxygène du  $\gamma$  phosphate.

Ces trois premiers motifs G1, G2 et G3 sont situés du même côté que les groupements phosphates du nucléotide (figure X1, figure X2)

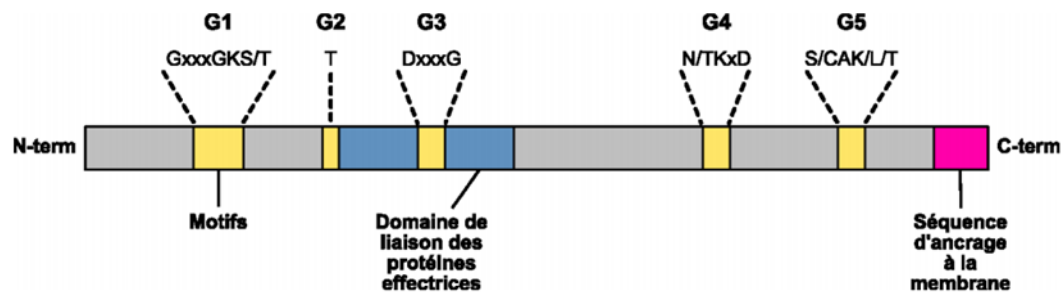
Le domaine G4 contient le motif N/TKxD (116-119). Ce motif est responsable de la spécificité des GTPases pour les nucléotides à base guanine, sert à la fixation de la base guanine. Les acides aminés asparagine et acide aspartique forment des liaisons hydrogènes avec la base, la lysine forme des contacts de van der Waals avec le noyau aromatique de la base. Le groupement carboxylique de l'aspartate interagit avec le groupement amine de la base et les protons du groupement amide de l'asparagine et de la lysine conservée stabilisent le site de fixation du nucléotide en interagissant avec les acides aminés de la région G1 (figure 60, figure 61).

Le motif G5, de séquence SAL/K n'est pas présent chez toutes les GTPases, le plus souvent, avec une alanine conservée qui est le plus souvent précédé d'une cystéine ou d'une sérine (figure 61, figure 61). Le motif G5 stabilise la base guanine en

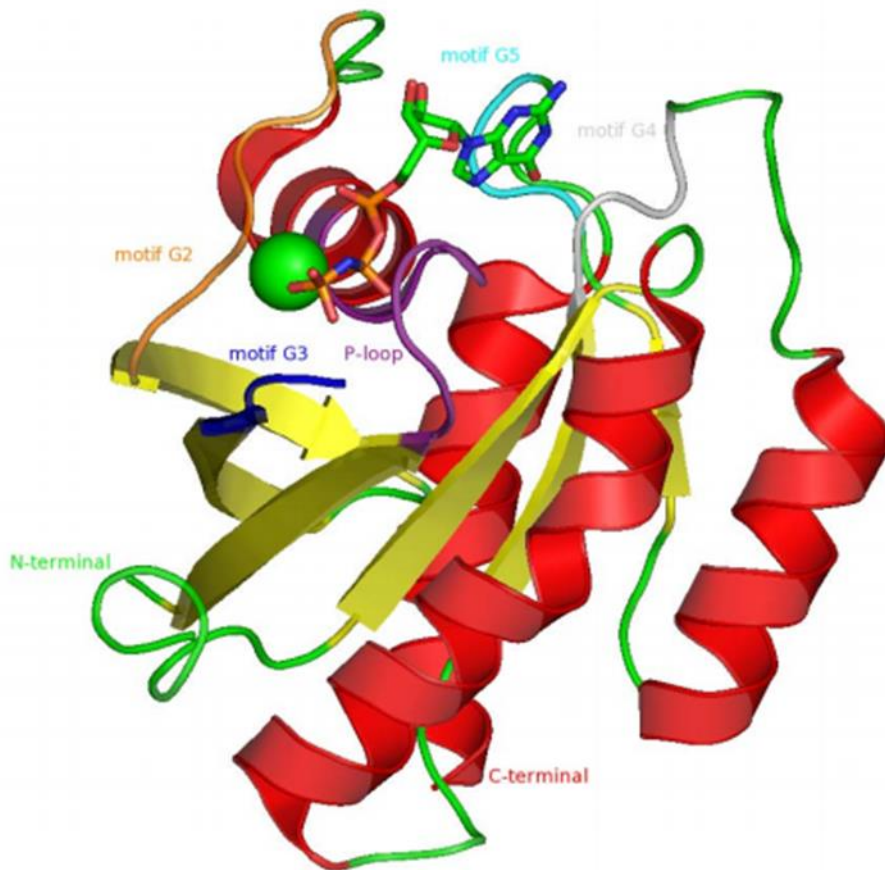
## Partie pratique

---

formant une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène O6 spécifique de la guanine (Bourne et al., 1991; Sprang, 1997; Schmoll et al., 2016; Mishra et al., 2010; Schmoll et al., 2016; Uejima et al., 2010). Les motifs G4 et G5 servent à fixer la base guanine, et donnent la spécificité pour le GTP et le GDP aux protéines qui les portent (Mishra et al., 2010; Schmoll et al., 2016; Uejima et al., 2010). La particularité de ces petites protéines G réside dans leur capacité à changer de structure en fonction du nucléotide fixé.



**Figure 60 :** Représentation de la structure des petites protéines G. Les motifs importants pour la liaison du GDP/GTP ainsi que le magnésium correspondent aux motifs G1 à G5. Le domaine de liaison des protéines effectrices est illustré en bleu tandis que le domaine responsable de l'ancrage à la membrane est illustré en rose (Schmoll et al., 2016).



**Figure 61** : structure de Ras.

Cette structure représente le domaine minimal de fixation du GTP, coloré selon les structures secondaires, hélice a en rouge feuillet b en jaune et boucle en vert. D'après le fichier pdb 2RGE, réalisé avec Pymol (Delano scientifique. Le motif G1 apparait en violet, le motif G2 ainsi que la boucle correspondant au switch I sont représentés en orange, le motif G3 est représenté en bleu, la région suivant le motif G3 et correspondant au switch 2 n'est pas résolu dans la structure. Le motif G4 est représenté en gris et le motif G5 en cyan. Le GMPPNP est représenté en bâtonnets colorés selon l'élément chimique et le magnésium est représenté par une sphère verte( Vajda et all 2013;Gheyouché , 2020)

Il est important de noter que les résultats de docking ne sont que des prédictions informatiques et doivent être validés expérimentalement. Cependant, les visualisations 2D peuvent aider à comprendre les résultats et à formuler des hypothèses sur les interactions protéine-ligand.

### Conclusion :

Au cours de cette étude bibliographique, nous avons abordé les caractéristiques des protéines G sous différents aspects structuraux, fonctionnels et leur implication dans les maladies.

Les protéines G hétérotrimériques sont impliquées dans la transmission de signaux entre les récepteurs de la membrane cellulaire et les voies de signalisation intracellulaires. Elles agissent comme des commutateurs moléculaires, régulant une variété de processus biologiques tels que la croissance cellulaire, la différenciation et la réponse aux stimuli. Elles se composent de trois sous-unités distinctes : l'alpha, la bêta et le gamma. La sous-unité  $\alpha$  est la principale composante fonctionnelle de la protéine G et joue un rôle clé dans l'interaction avec les nucléotides GDP (guanosine diphosphate) et GTP (guanosine triphosphate).

Le domaine G, qui caractérise la plupart des GTPases, forme le site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides ou mononucleotide-binding domain. Le domaine G est responsable de changements de conformation dépendant des nucléotides : il agit comme un commutateur moléculaire (switch) entre l'état désactivé lié au GDP et l'état activé lié au GTP.

La partie pratique de cette étude vise à approfondir notre compréhension de l'interaction entre la sous-unité  $\alpha$  et les GDP/GTP par le biais d'une étude de docking moléculaire.

L'étude du docking moléculaire entre la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G et les nucléotides GDP/GTP revêt une grande importance dans la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire et la conception de médicaments ciblant cette voie.

La modélisation et le docking moléculaire sont des outils couramment utilisés pour étudier ces interactions et identifier de nouveaux composés capables de moduler l'activité des protéines G.

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné trois ligands : le GDP, le GTP et un analogue du GTP non hydrolysable (5'GTP $\gamma$ S). Ces ligands ont été choisis afin d'identifier la composition du site GTPasique, ainsi que la nature des interactions et leurs affinités correspondantes.

L'utilisation du logiciel MOE nous a permis de prédire les interactions et d'estimer les affinités entre les sous-unités  $\alpha$  et les ligands. L'affinité de liaison ou Score d'amarrage a été évaluée par l'énergie libre de liaison (Kcal / mol).

En fait, les ligands sélectionnés pour cette étude, GTP, Analogue et GDP peuvent établir une liaison avec la sous-unité  $\alpha$  de la 6EG8.

## Partie pratique

---

Le ligand 5'GTP $\gamma$ S a présenté des énergies de liaison de l'ordre -14.6644 Kcal/mol suivie du GTP de l'ordre -9,5571 Kcal/mol et du GDP de l'ordre de -8.9847 Kcal/mol.

Il est à noter que les trois ligands présentent les mêmes interactions avec la sous-unité  $\alpha$  de la 6EG8. Les acides aminés en commun entre les deux nucléotides et guanine sont : Glu268, Ala48 et Glu50, le Ribose avec Val224, Lys53, Phosphate  $\alpha$  avec Glu50, Ser51, Arg201, Lys53, Thr204. Lys53, Phosphate  $\beta$  avec Ser54, Lys53, Gly52, Ser51, Arg201, Et Phosphate  $\gamma$  avec Val202, Lys58, Thr55, Arg201.

L'ion magnésium se complexe aux nucléotides en formant des liaisons avec un oxygène du phosphate  $\beta$  et un oxygène du phosphate  $\gamma$ .

La particularité de ces protéines G réside dans leur capacité à changer de structure en fonction du nucléotide fixé.

Grâce à cette approche, nous avons pu identifier la composition du site GTPasique et caractériser les interactions spécifiques entre les sous-unités alpha et les ligands GDP, GTP et analogue du GTP non hydrolysable.

Il est important de noter que les résultats de docking ne sont que des prédictions informatiques et doivent être validés expérimentalement. Cependant, les visualisations 2D peuvent aider à comprendre les résultats et à formuler des hypothèses sur les interactions protéine-ligand.

En termes de perspectives, il serait intéressant de rechercher des composés capables de moduler ces interactions entre les sous-unités alpha et les ligands GDP/GTP, dans le but thérapeutique. Ces composés pourraient potentiellement servir de candidats pour le développement de nouvelles thérapies ciblant des processus biologiques impliquant ces interactions.

Des techniques telles que la modélisation moléculaire, la chimioinformatique et la chimie médicinale pourraient être employées pour concevoir des ligands à affinité élevée et sélective.

- Screening expérimental : entreprendre des expériences de criblage à haut débit en utilisant des bibliothèques de composés chimiques pour identifier des molécules qui modulent l'interaction entre les sous-unités alpha et les ligands GDP/GTP.

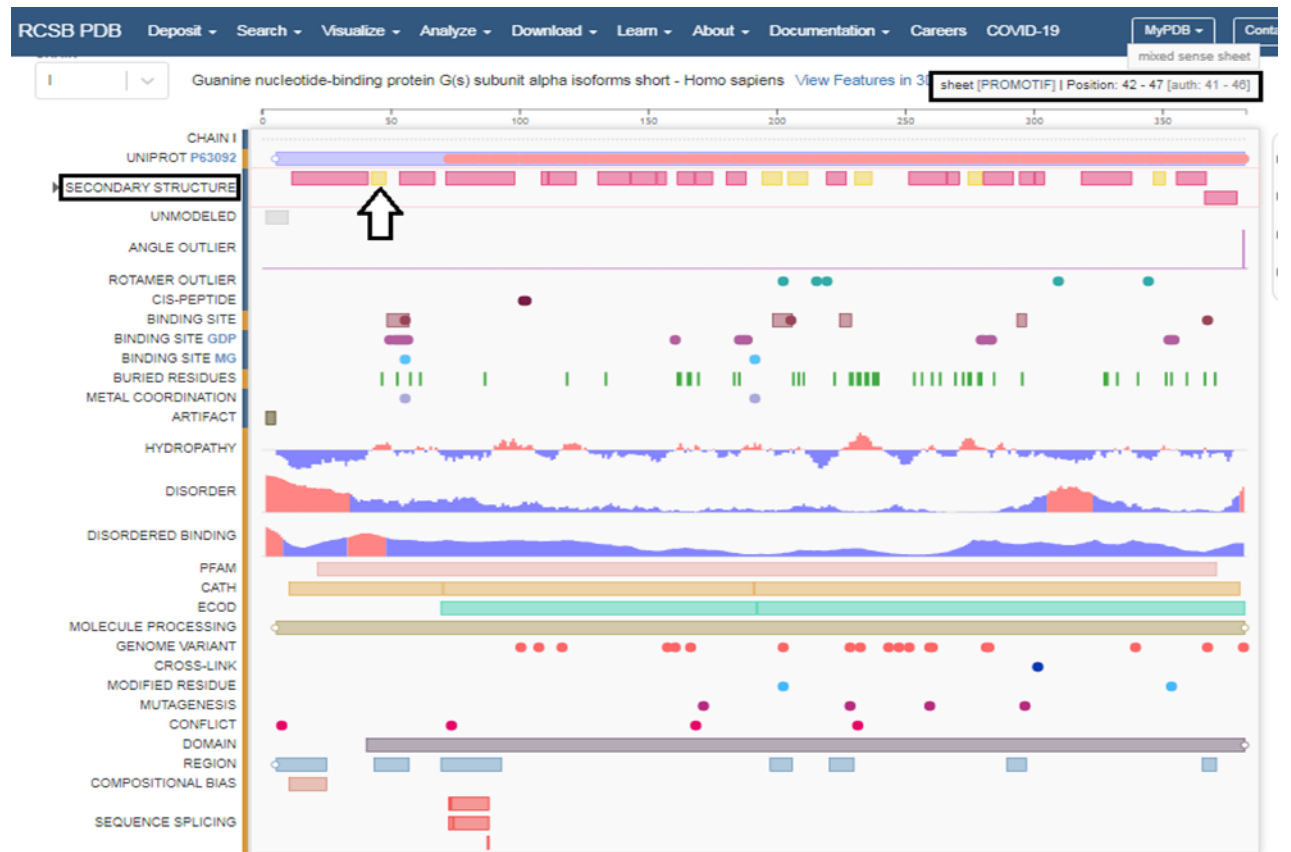
## Annexes

### ANNEXES :



Position des hélices  $\alpha$  de la sous unité  $\alpha_s$  ( pdb)

# Annexes



Position des chaines  $\beta$  de la sous unité  $\alpha$ s ( pdb)

## Annexes



Position et sites d'interaction du GDP avec la sous unité  $\alpha$ s



Position et sites de fixation du  $Mg^{2+}$  avec la sous unité  $\alpha$ s

## Annexes

---

### Non-bonded contacts

-----

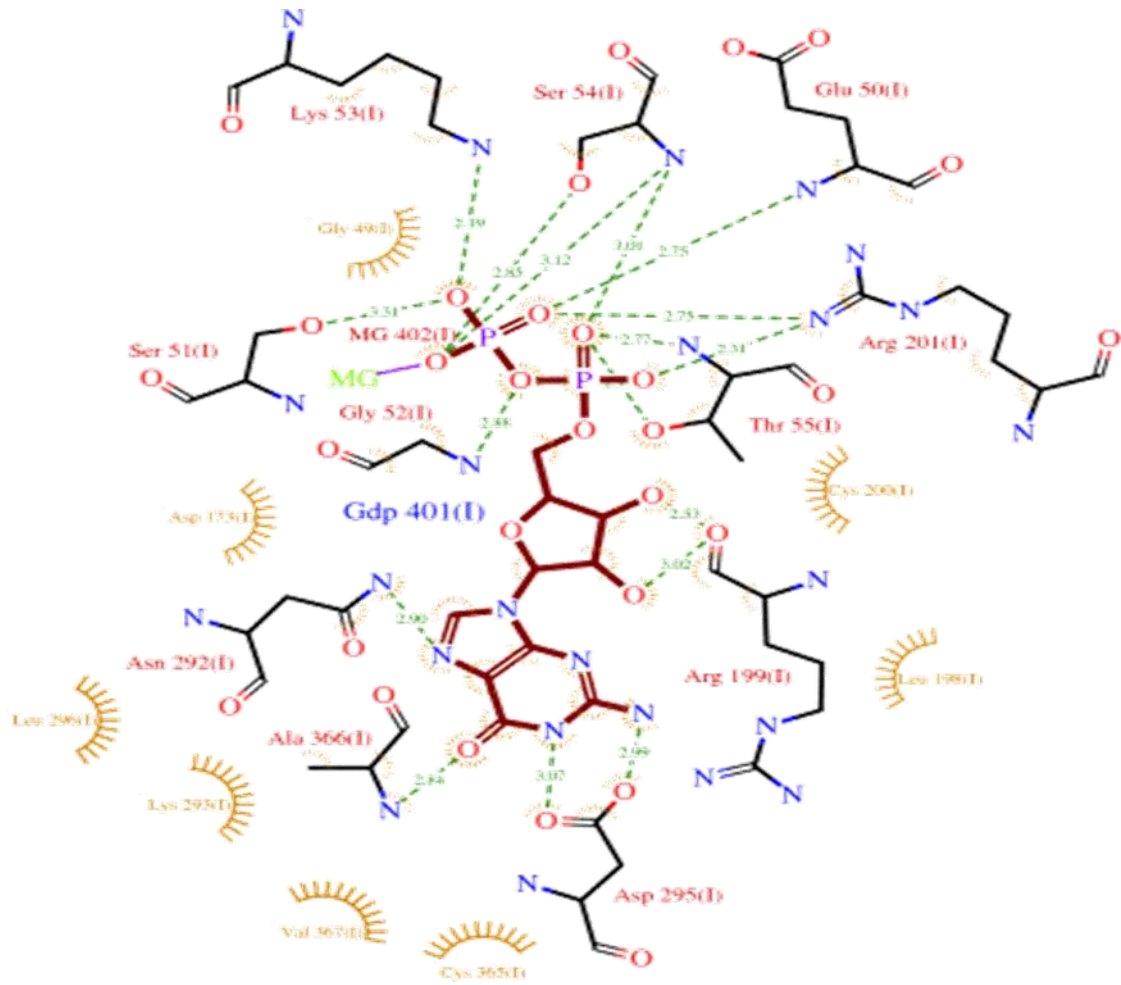
	<----- A T O M 1 ----->						<----- A T O M 2 ----->					
	Atom	Atom	Res	Res	Chain		Atom	Atom	Res	Res	Chain	Distance
	no.	name	name	no.			no.	name	name	no.		
1.	12551	O	ALA	48	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.41
2.	12555	C	GLY	49	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.79
3.	12557	N	GLU	50	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.58
4.	12557	N	GLU	50	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	2.75
5.	12557	N	GLU	50	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.66
6.	12557	N	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.86
7.	12558	CA	GLU	50	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.37
8.	12558	CA	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.61
9.	12559	C	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.72
10.	12566	N	SER	51	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.48
11.	12566	N	SER	51	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.47
12.	12571	OG	SER	51	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.31
13.	12572	N	GLY	52	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.87
14.	12572	N	GLY	52	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.58
15.	12572	N	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	2.88
16.	12573	CA	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.36
17.	12573	CA	GLY	52	I	---	24437	PA	GDP	401	I	3.90
18.	12573	CA	GLY	52	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.69
19.	12574	C	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.73
20.	12574	C	GLY	52	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.60
21.	12576	N	LYS	53	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.69
22.	12576	N	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.35
23.	12576	N	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.76
24.	12576	N	LYS	53	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.38
25.	12576	N	LYS	53	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.67
26.	12580	CB	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.50
27.	12580	CB	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.71
28.	12581	CG	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.38

## Annexes

---

29.	12582	CD	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.80
30.	12583	CE	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.13
31.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.43
32.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.89
33.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	2.19
34.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.84
35.	12585	N	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.12
36.	12585	N	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.01
37.	12586	CA	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.37
38.	12587	C	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.42
39.	12589	CB	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.51
40.	12589	CB	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.29
41.	12590	OG	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	2.85
42.	12591	N	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	2.77
43.	12592	CA	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.76
44.	12595	CB	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.69
45.	12596	OG1	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	2.99
46.	12596	OG1	THR	55	I	---	24440	O5'	GDP	401	I	3.67
47.	12596	OG1	THR	55	I	---	24446	C2'	GDP	401	I	3.83
48.	12596	OG1	THR	55	I	---	24450	C8	GDP	401	I	3.80
49.	13447	OD2	ASP	173	I	---	24443	O4'	GDP	401	I	3.40
50.	13447	OD2	ASP	173	I	---	24448	C1'	GDP	401	I	3.79
51.	13646	O	LEU	198	I	---	24446	C2'	GDP	401	I	3.63
52.	13646	O	LEU	198	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.48
53.	13652	CA	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.17
54.	13653	C	ARG	199	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.40
55.	13653	C	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.42
56.	13654	O	ARG	199	I	---	24444	C3'	GDP	401	I	3.67
57.	13654	O	ARG	199	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	2.53
58.	13654	O	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.02
59.	13664	C	CYS	200	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.58
60.	13665	O	CYS	200	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.51
61.	13668	N	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.65
62.	13669	CA	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.68
63.	13672	CB	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.68
64.	13674	CD	ARG	201	I	---	24441	C5'	GDP	401	I	3.69

Schéma structure secondaire de la sous unité  $\alpha$  de la protéine G (6EG8)pdb sum



Représentation du LIGPLOT des interactions du ligand GDP (pdb sum)

## Annexes

---

### Non-bonded contacts

-----

	<----- A T O M 1 ----->						<----- A T O M 2 ----->					
	Atom	Atom	Res	Res	Chain		Atom	Atom	Res	Res	Chain	Distance
	no.	name	name	no.			no.	name	name	no.		
1.	12551	O	ALA	48	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.41
2.	12555	C	GLY	49	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.79
3.	12557	N	GLU	50	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.58
4.	12557	N	GLU	50	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	2.75
5.	12557	N	GLU	50	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.66
6.	12557	N	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.86
7.	12558	CA	GLU	50	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.37
8.	12558	CA	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.61
9.	12559	C	GLU	50	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.72
10.	12566	N	SER	51	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.48
11.	12566	N	SER	51	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.47
12.	12571	OG	SER	51	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.31
13.	12572	N	GLY	52	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.87
14.	12572	N	GLY	52	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.58
15.	12572	N	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	2.88
16.	12573	CA	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.36
17.	12573	CA	GLY	52	I	---	24437	PA	GDP	401	I	3.90
18.	12573	CA	GLY	52	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.69
19.	12574	C	GLY	52	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.73
20.	12574	C	GLY	52	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.60
21.	12576	N	LYS	53	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.69
22.	12576	N	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.35
23.	12576	N	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.76
24.	12576	N	LYS	53	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.38
25.	12576	N	LYS	53	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.67
26.	12580	CB	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.50
27.	12580	CB	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.71
28.	12581	CG	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.38

## Annexes

---

29.	12582	CD	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.80
30.	12583	CE	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	3.13
31.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.43
32.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.89
33.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24434	O2B	GDP	401	I	2.19
34.	12584	NZ	LYS	53	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.84
35.	12585	N	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.12
36.	12585	N	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.01
37.	12586	CA	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.37
38.	12587	C	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.42
39.	12589	CB	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	3.51
40.	12589	CB	SER	54	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.29
41.	12590	OG	SER	54	I	---	24435	O3B	GDP	401	I	2.85
42.	12591	N	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	2.77
43.	12592	CA	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.76
44.	12595	CB	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	3.69
45.	12596	OG1	THR	55	I	---	24438	O1A	GDP	401	I	2.99
46.	12596	OG1	THR	55	I	---	24440	O5'	GDP	401	I	3.67
47.	12596	OG1	THR	55	I	---	24446	C2'	GDP	401	I	3.83
48.	12596	OG1	THR	55	I	---	24450	C8	GDP	401	I	3.80
49.	13447	OD2	ASP	173	I	---	24443	O4'	GDP	401	I	3.40
50.	13447	OD2	ASP	173	I	---	24448	C1'	GDP	401	I	3.79
51.	13646	O	LEU	198	I	---	24446	C2'	GDP	401	I	3.63
52.	13646	O	LEU	198	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.48
53.	13652	CA	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.17
54.	13653	C	ARG	199	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.40
55.	13653	C	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.42
56.	13654	O	ARG	199	I	---	24444	C3'	GDP	401	I	3.67
57.	13654	O	ARG	199	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	2.53
58.	13654	O	ARG	199	I	---	24447	O2'	GDP	401	I	3.02
59.	13664	C	CYS	200	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.58
60.	13665	O	CYS	200	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.51
61.	13668	N	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.65
62.	13669	CA	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.68
63.	13672	CB	ARG	201	I	---	24445	O3'	GDP	401	I	3.68
64.	13674	CD	ARG	201	I	---	24441	C5'	GDP	401	I	3.69

## Annexes

---

64.	13674	CD	ARG	201	I	---	24441	C5'	GDP	401	I	3.69
65.	13676	CZ	ARG	201	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.63
66.	13676	CZ	ARG	201	I	---	24439	O2A	GDP	401	I	3.59
67.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24432	PB	GDP	401	I	3.71
68.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	2.75
69.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24436	O3A	GDP	401	I	3.76
70.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24437	PA	GDP	401	I	3.45
71.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24439	O2A	GDP	401	I	2.31
72.	13677	NH1	ARG	201	I	---	24441	C5'	GDP	401	I	3.52
73.	13678	NH2	ARG	201	I	---	24433	O1B	GDP	401	I	3.68
74.	14437	CG	ASN	292	I	---	24451	N7	GDP	401	I	3.74
75.	14437	CG	ASN	292	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.77
76.	14438	OD1	ASN	292	I	---	24451	N7	GDP	401	I	3.85
77.	14438	OD1	ASN	292	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.02
78.	14439	ND2	ASN	292	I	---	24450	C8	GDP	401	I	3.74
79.	14439	ND2	ASN	292	I	---	24451	N7	GDP	401	I	2.90
80.	14439	ND2	ASN	292	I	---	24452	C5	GDP	401	I	3.81
81.	14440	N	LYS	293	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.48
82.	14441	CA	LYS	293	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.53
83.	14445	CG	LYS	293	I	---	24452	C5	GDP	401	I	3.77
84.	14445	CG	LYS	293	I	---	24453	C6	GDP	401	I	3.78
85.	14463	CG	ASP	295	I	---	24455	N1	GDP	401	I	3.55
86.	14463	CG	ASP	295	I	---	24457	N2	GDP	401	I	3.82
87.	14464	OD1	ASP	295	I	---	24453	C6	GDP	401	I	3.80
88.	14464	OD1	ASP	295	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.72
89.	14464	OD1	ASP	295	I	---	24455	N1	GDP	401	I	3.07
90.	14464	OD1	ASP	295	I	---	24457	N2	GDP	401	I	3.90
91.	14465	OD2	ASP	295	I	---	24455	N1	GDP	401	I	3.26
92.	14465	OD2	ASP	295	I	---	24456	C2	GDP	401	I	3.58
93.	14465	OD2	ASP	295	I	---	24457	N2	GDP	401	I	2.99
94.	14471	CG	LEU	296	I	---	24457	N2	GDP	401	I	3.59
95.	14472	CD1	LEU	296	I	---	24456	C2	GDP	401	I	3.82
96.	14472	CD1	LEU	296	I	---	24457	N2	GDP	401	I	3.46
97.	14473	CD2	LEU	296	I	---	24457	N2	GDP	401	I	3.79
98.	15031	CA	CYS	365	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.48
99.	15032	C	CYS	365	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.47
100.	15035	SG	CYS	365	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.58
101.	15036	N	ALA	366	I	---	24453	C6	GDP	401	I	3.81
102.	15036	N	ALA	366	I	---	24454	O6	GDP	401	I	2.84
103.	15037	CA	ALA	366	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.82
104.	15040	CB	ALA	366	I	---	24451	N7	GDP	401	I	3.30
105.	15041	N	VAL	367	I	---	24454	O6	GDP	401	I	3.72
106.	15046	CG1	VAL	367	I	---	24452	C5	GDP	401	I	3.76
107.	15046	CG1	VAL	367	I	---	24458	N3	GDP	401	I	3.82
108.	15046	CG1	VAL	367	I	---	24459	C4	GDP	401	I	3.65
109.	15047	CG2	VAL	367	I	---	24453	C6	GDP	401	I	3.68
110.	15047	CG2	VAL	367	I	---	24455	N1	GDP	401	I	3.33
111.	15047	CG2	VAL	367	I	---	24456	C2	GDP	401	I	3.62

Number of hydrogen bonds: 19

Number of non-bonded contacts: 111

Intéractions du GDP avec la sous unité  $\alpha$

## Annexes

---

PDB code: 6eg8 Metal MG

-----

### Hydrogen bonds

-----

	<----- A T O M 1 ----->						<----- A T O M 2 ----->					
	Atom	Atom	Res	Res			Atom	Atom	Res	Res		Distance
	no.	name	name	no.	Chain		no.	name	name	no.	Chain	
1.	12590	OG	SER	54	I	<->	24460	MG	MG	402	I	2.37
2.	13699	OG1	THR	204	I	<->	24460	MG	MG	402	I	2.66

### Non-bonded contacts

-----

	<----- A T O M 1 ----->						<----- A T O M 2 ----->					
	Atom	Atom	Res	Res			Atom	Atom	Res	Res		Distance
	no.	name	name	no.	Chain		no.	name	name	no.	Chain	
1.	12589	CB	SER	54	I	::	24460	MG	MG	402	I	3.55
2.	12590	OG	SER	54	I	::	24460	MG	MG	402	I	2.37
3.	13698	CB	THR	204	I	::	24460	MG	MG	402	I	3.38
4.	13699	OG1	THR	204	I	::	24460	MG	MG	402	I	2.66
5.	13861	OD2	ASP	223	I	::	24460	MG	MG	402	I	3.89

Number of hydrogen bonds: 2

Number of non-bonded contacts: 5

Interaction du Mg<sup>2+</sup> avec la sous unité  $\alpha$

## **Références bibliographiques :**

## Références bibliographiques

---

- Schulz-Gasch, M., 2014 « Scoring Functions for Protein-ligand Interactions: A Critical Perspective », *Drug Discovery Today: Technologies*, , 1, 231-239.
- R. Wang, Y. Lu, X. Fang, S. Wang, 2014, « An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes », *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, (Kenakin and Miller, 2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 62, 265-304.
- Kondru, R., Zhang, J., Ji, C., Mirzadegan, T., Rotstein, D., Sankuratri, S., and Dioszegi, M. (2008). Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 73, 789-800.
- Garzino-Demo, A., Moss, R.B., Margolick, J.B., Cleghom, F., Sill, A., Blattner, W.A.,
- Cocchi, F., Carlo, D.J., DeVico, A.L., and Gallo, R.C. (1999). Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11986-11991.
- 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.
- Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T., and Kobayashi, T. (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482, 547-551.
- Heredia, A., Amoroso, A., Davis, C., Le, N., Reardon, E., Dominique, J.K., Klingebiel, E., Gallo, R.C., and Redfield, R.R. (2003). Rapamycin causes down-regulation of CCR5 and accumulation of anti-HIV beta-chemokines: an approach to suppress R5 strains of HIV -1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10411-10416
- Shieh, B., Yan, Y.P., Ko, N.Y., Liao, Y.E., Liu, Y.C., Lin, H.H., Chen, P.P., and Li, C. (2001). Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis.* 33, 273-279.
- BIOvIA, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. San Diego, Dassault Systemes, Release, 4.
- Teniou S. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses, Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2017. 95 p

## Références bibliographiques

---

- Amina Merzoug : recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptidyl déformylase, biochimie, Université des Frères Mentouri Constantine1, 2018, 189 p.
- Mme Lalout Wassila née soufi : contribution à la modélisation des interactions dans les biomolécules : cas de la maladie de Parkinson, Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire, université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, 2016, 129 p.
- Valerio, L.G., Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019. 241(3): p. 356-70.
- BIOvIA, D. S. (2015). Discovery studio modeling environment. San Diego, Dassault Systemes, Release, 4.
- Alban A., Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Other. Universités d'Orléans. France, (2007). 191p.
- Ullum, H., Cozzi Lepri, A., Victor, J., Aladdin, H., Phillips, A.N., Gerstoft, J., Skinhoj, P., and Pedersen, B.K. (1998). Production of beta-chemokines in human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence that high levels of macrophage inflammatory protein-1 beta are associated with a decreased risk of HIV disease progression. *J. Infect. Dis.* 177, 331 - 336.
- Zhang, Y., Rodriguez, A.L., and Conn, P.J. (2005). Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 1212-1219.
- Lane, J.R., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2013). Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 59-66.
- Kruse, A.C., Hu, J., Pan, A.C., Arlow, D.H., Rosenbaum, D.M., Rosemond, E., Green, H.F., Liu, T., Chae, P.S., Dror, R.O., et al. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 482, 552-556.
- Muniz-Medina, V.M., Jones, S., Maglich, J.M., Galardi, C., Hollingsworth, R.E., Kazmierski, W.M., Ferris, R.G., Edelstein, M.P., Chiswell, K.E., and Kenakin, T.P. (2009). The relative activity of "function sparing" HIV-1 entry inhibitors on viral entry and CCR5 internalization: is allosteric functional selectivity a valuable therapeutic property? *Mol. Pharmacol.* 75, 490-501.
- Redka, D.S., Pisterzi, L.F., and Wells, J.W. (2008). Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 74, 834-843.

## Références bibliographiques

---

- O'Brien, J.A., Lemaire, W., Chen, T.B., Chang, R.S., Jacobson, M.A., Ha, S.N., Lindsley, C.W., Schaffhauser, H.J., Sur, C., Pettibone, D.J., Conn, P.J., and Williams, D.L., Jr. (2003). A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Mol. Pharmacol.* 64, 731-740.
- 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.
- Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 131-137.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 274-286.
- Salahpour, A., Angers, S., and Bouvier, M. (2000). Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 163-168.
- Audet, M., and Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell* 151, 14-23.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., et al. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* 6, 587-594.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.
- Franco, R., Casado, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferre, S., Fuxe, K., Cortes, A., Ciruela, F., Lluís, C., and Canela, E.I. (2006). The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol. Pharmacol.* 69, 1905-1912.
- Durroux, T. (2005). Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 376-384.
- El-Asmar, L., Springael, J.Y., Ballet, S., Andrieu, E.U., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol. Pharmacol.* 67, 460-469.

## Références bibliographiques

---

- AbdAlla, S., Lothar, H., and Quitterer, U. (2000). ATI-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94-98.
- Kenakin, T. (2002). Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 103-110.
- Hunyady, L., and Catt, K.J. (2006). Pleiotropic ATI receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 20, 953-970.
- Holloway, A.C., Qian, H., Pipolo, L., Ziogas, J., Miura, S., Kamik, S., Southwell, B.R., Lew, M.J., and Thomas, W.G. (2002). Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Mol. Pharmacol.* 61, 768-777.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Kamik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10782-10787.
- Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2006). Structural basis of chemokine receptor function-a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci. Rep.* 26, 325-339.
- Revankar, C.M., Vines, C.M., Cimino, D.F., and Prossnitz, E.R. (2015). Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 24578-24584.
- D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B., and Dom, G.W., 2nd. (1997). Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8121-8126.
- DeFea, K.A., Vaughn, Z.D., O'Bryan, E.M., Nishijima, D., Dery, O., and Bunnett, N.W. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11086-11091.
- Mathiesen, J.M., Ulven, T., Martini, L., Gerlach, L.O., Heinemann, A., and Kostenis, E. (2005). Identification of indole derivatives exclusively interfering with a G protein-independent signaling pathway of the prostaglandin D2 receptor CRTH2. *Mol. Pharmacol.* 68, 393-402.

## Références bibliographiques

---

- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G.W., Huang, X.P., Vardy, E., McCorvy, J.D., Jiang, Y., Chu, M., Siu, F.Y., et al. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* 340, 615-619.
- Bockaert J, Audigier Y, Homburger V, Rouot B. Les protéines G de transduction. In : Landry Y, Gies J, eds. Paris : Arnette, 1.993 : 137-72.
- Parenti M, Vigano M, Newman CMH, Milligan G, Magee Al. A novel N-terminal motif for palmitoylation of Gprotein a su-bunits. *Biochemj* 1993 ; 291 : 349-53.
- Journot L, Pantaloni C, Poul MA, Mazarguil H, Bockaert J, Audigier Y. Amino-acids 367-376 of the Gs a subunit inducemembrane association when fused to the so-luble amino-terminal deleted Gi1 a subunit. *Proc Natl Acad Sei USA* 1991 ; 88 : 10054-8.
- Chabre M, Deterre P. Molecular mecha-nism of visual transduction. *Eur J Biochem* 1989 ; 179 : 255-6.
- Bockaert J. G proteins and Gprotein-coupled recq: >tors : structure, funcuon and interactions. *Curr op NeuroUiol* 1991 ; 1: 32-42.
- Speng ler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer r, Bockaert J, Seeburg PH, Jour-not
- L. Diff erentiai signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 1993 ; 365 : 170-5.
- Coughlin SR. Expanding horizons for receptors coupled to G pro tei ns : diversity
- and disease. *Curr Op Biol* 1 994 ; 6: 19 1-7.
- Iqelsber g MA, Cotecchia S, Ostrowski J, Caron MC, Lefkowitz RJ. Constitutive activa-tion of the <X18-adrenergic receptor by ali amino acid substitutions at a single site. *j Biol Chem* 1992 ; 267 : 1430-3.
- Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samana P, Costa T. Constitutive activity of receptors
- coupled to guanine nucleotide regulatory pro tei ns. *Treiuls Pharmacol Sei* 1993 ; 14 : 303-4.
- Barker EL, Westphal RS, Schmidt D, Sanders-Busch E. Constitutively active 5-hydroxytryptamine2c receptors reveal novel in-verse agonist activity oi receptor ligands. *j Biol Chem* 1994 ; 269 : 11 687-90.

## Références bibliographiques

---

- . Costa T, Herz A. Antagonists with negative intrinsic activity at opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 7321-5.
- . Götze K, Takobs KH. Unoccupied 13-adrenoceptor-induced adenylyl cyclase stimulation in turkey erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 268 : 151-8.
- . Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy G, Mockel J, Dumont J, Vas-sart G. Somatostatin mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenoma. *Nature* 1993 ; 365 : 649-51. f. Maenhaut C, Pirson I, Bostant M, Lamy F, Miot F, Roger P, Dumont J. La cascade mitogène de l'AMPc dans la thyroïde et dans d'autres tissus. *médecine/sciences* 1995 ; II: 204-14.
- - Van den Ouweland AMW, Dreesen TCFM, Verdijk M, Knoers NVAM, Monnens LAH, Rocchi M, Van Oost BA. Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Genet* 1992 ; 2: 99-102.
- - Darbon J.M. — Les voies des MAP Kinases : ERK, p38 et JNK. In *Thérapie ciblées des cancers : Les cibles intracytoplasmiques*. Edition John Libbey Eurotext., 2011. - Favre G. — Ras, cible de thérapies antitumorales. In *Thérapie ciblées des cancers : Les cibles intracytoplasmiques*. Edition John Libbey Eurotext ; 2011.
- Robert Lefkowitz et Brian Kobilka. ([http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2012/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2012/))
- Salon, J. A., Lodowski, D. T., & Palczewski, K. (2011). The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(4), 901–937 <https://doi.org/10.1124/pr.110.003350>
- Khalil M, 2016, Interactions et stabilité des protéines étudiées par spectroscopie infrarouge et Raman, thèse de doctorat, université de Strasbourg (France)
- MC Lagerstrom and HB Schiöth (2008): Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery *Nat.Rev.Drug Discov.* 7:339.
- HB Schiöth and R Fredriksson (2005): The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen.Comp Endocrinol.* 142:94.

## Références bibliographiques

---

- Bockaert J and Pin JP (1998) [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C R Acad Sci III* **321**(7):529-551.
- Gershengorn MC and Osman R (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142**(1):2-10.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H and Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* **520**(1-3):97-101.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE and Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8):4903-4908 Epub 2003 Apr 4904.
- Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR and Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356**(6365):159-161.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G-protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480):739-745
- Bockaert J., Pin J.P. — Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO Journal*, 1999, 18, 1723-1729.
- Dale, L.B., Babwah, A.V., and Ferguson, S.S. (2002). Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitization: role in the patterning of effector enzyme activation. *Neurochem. Int.* **41**, 319-326.
- Gales, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T.E., and Bouvier, M. (2005). Realtime monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **2**, 177-184.
- Rebois, R.V. and Hebert, T.E. (2003). Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors. Channels* **9**, 169-194.
- Afshar, K., Willard, F.S., Colombo, K., Johnston, C.A., McCudden, C.R., Siderovski, D.P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent G $\alpha$  function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* **119**, 219-230
- Blackmer, T., Larsen, E.C., Bartleson, C., Kowalchuk, J.A., Yoon, E.J., Preininger, A.M., Alford, S., Hamm, H.E., and Martin, T.F. (2005). G protein

## Références bibliographiques

---

- betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat. Neurosci.* 8, 421-425
- Cabrera-Vera, T.M., Vanhauwe, J., Thomas, T.O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M.R., and Hamm, H.E. (2003). Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24, 765-781.
  - Cismowski, M.J., Takesono, A., Ma, C., Lizano, J.S., Xie, X., Fuernkranz, H., Lanier, S.M., and Duzic, E. (1999). Genetic screens in yeast to identify mammalian nonreceptor modulators of G-protein signaling. *Nat. Biotechnol.* 17, 878-883.
  - Doupnik, C.A., Davidson, N., Lester, H.A., and Kofuji, P. (1997). RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of Gbetagamma-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10461-10466.
  - Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
  - Garritsen, A., van Galen, P.J., and Simonds, W.F. (1993). The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for G-protein beta gamma subunit interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7706-7710.
  - Hanoune, J. and Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 41, 145-174.
  - Kisselev, O., Ermolaeva, M., and Gautam, N. (1995a). Efficient interaction with a receptor requires a specific type of prenyl group on the G protein gamma subunit. *J. Biol. Chem.* 270, 25356-25358
  - Knoblich, J.A. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 11-20.
  - Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., and Sigler, P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.
  - Lanier, S.M. (2004). AGS proteins, GPCR motifs and the signals processed by heterotrimeric G proteins. *Biol. Cell* 96, 369-372
  - Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2001a). Ligand-induced signal transduction within heterodimeric GABA(B) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14643-14648.
  - Ohno, S. and Nishizuka, Y. (2002). Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 509-511

## Références bibliographiques

---

- Richman,R.W., Strock,J., Hains,M.D., Cabanilla,N.J., Lau,K.K., Siderovski,D.P., and Diverse- Pierluissi,M. (2005). RGS12 interacts with the SNARE-binding region of the Cav2.2 calcium channel. *J. Biol. Chem.* *280*, 1521-1528.
- Ross,E.M. and Wilkie,T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 795-827.
- Saitoh,O., Kubo,Y., Miyatani,Y., Asano,T., and Nakata,H. (1997). RGS8 accelerates G-proteinmediated modulation of K<sup>+</sup> currents. *Nature* *390*, 525-529.
- Schaefer,M., Shevchenko,A., Shevchenko,A., and Knoblich,J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 353-362.
- Schiff,M.L., Siderovski,D.P., Jordan,J.D., Brothers,G., Snow,B., De Vries,L., Ortiz,D.F., and Diverse-Pierluissi,M. (2000). Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature* *408*, 723-727.
- Siderovski,D.P., Diverse-Pierluissi,M., and De Vries,L. (1999). The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 340-341.
- Takesono,A., Cismowski,M.J., Ribas,C., Bernard,M., Chung,P., Hazard,S., III, Duzic,E., and Lanier,S.M. (1999). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *274*, 33202-33205.
- Tall,G.G., Krumins,A.M., and Gilman,A.G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* *278*, 8356-8362.
- Tesmer,J.J., Berman,D.M., Gilman,A.G., and Sprang,S.R. (1997a). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* *89*, 251-261.
- Tosetti,P., Turner,T., Lu,Q., and Dunlap,K. (2002). Unique isoform of Galpha -interacting protein (RGS-GAIP) selectively discriminates between two Go-mediated pathways that inhibit Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* *277*, 46001-46009.
- Taylor,J.M., Jacob-Mosier,G.G., Lawton,R.G., Remmers,A.E., and Neubig,R.R. (1994). Binding of an alpha 2 adrenergic receptor third intracellular loop peptide to G beta and the amino terminus of G alpha. *J. Biol. Chem.* *269*, 27618-27624.

## Références bibliographiques

---

- Lambright,D.G., Sondek,J., Bohm,A., Skiba,N.P., Hamm,H.E., and Sigler,P.B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.
- Manes,S., del Real,G., Lacalle,R.A., Lucas,P., Gomez-Mouton,C., Sanchez-Palomino,S., Delgado,R., Alcami,J., Mira,E., and Martinez,A. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep.* 1, 190-196
- McIntire,W.E., MacCleery,G., and Garrison,J.C. (2001). The G protein beta subunit is a determinant in the coupling of Gs to the beta 1-adrenergic and A2a adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 15801-15809
- Neer,E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Denis, C., Saulière, A., Galandrin, S., Sénard, J. M., & Galés, C. (2012). Probing heterotrimeric G protein activation: applications to biased ligands. *Current pharmaceutical design*, 18(2), 128
- McIntire, W. E. (2009). Structural determinants involved in the formation and activation of G protein  $\beta\gamma$  dimers. *Neurosignals*, 17(1), 82-99

- Tuteja, N. (2009), 'Signaling through G protein coupled receptors.', *Plant Signal Behav* 4(10), 942—947.
- (Mobarec, J. C. & Filizola, M. (2008), 'Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors.' *Expert Opin Drug Discov* 3(3), 343—355 (Pelé, 2010)
- Ref (Nos récepteurs déroulent leur mécanique ! Maxime Louet, Landry Charlier, Jean Martinez et Nicolas Floquet , 'actualité chimique - décembre 2013 - n° 380
- Généralités Rémi MAGNAN Mathieu SCHAFF
- Reference Identification et caractérisation d'un nouveau rôle de la sous-unité Gasau niveau du compartiment endosomal Par Rosciglione Stéphanie
- Reference : Rôle des récepteurs couplés aux protéines Gadrénergiques dans la toxicité des hydrocarburesaromatiques polycycliques Thomas Déséchalliers
- Referenece : Études par dynamique moléculaire de l'interaction deRécepteurs Couplés aux Protéines-G avec leurspartenaires extra et intra-cellulairesBartholome Delort
- Reference : dentification de nouveaux mécanismes de la prostaglandine D synthase de type licopalin (L-PGDS) dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur à la prostaglandine D2 DP1ParChantal Binda
- Referenece : Dynamique structurale de complexes RCPG - neuropeptidesGuillaume Ferre
- Reference :Nos récepteurs déroulent leur mécanique ! Maxime Louet, Landry Charlier, Jean Martinez et Nicolas Floquet , 'actualité chimique - décembre 2013 - n° 380
- These Mathieu SCHAFFet Structure Aude Karine Sauliere
- Reference : Rôle des récepteurs couplés aux protéines Gadrénergiques dans la toxicité des hydrocarburesaromatiques polycycliques par Thomas Déséchalliers
- Toshio Hakoshima\*, Toshiyuki Shimizu<sup>3</sup> and Ryoko Maesaki<sup>1,4</sup>, Structural Basis of the Rho GTPase Signaling, *J.Biochem.* 134,327-331(2003).
-

## Références bibliographiques

---

- De Vries L, Mousli M, Wurmser A and Farquhar MG (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25):11916-11920
- Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR and Bourne HR (1992) Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* 356(6365):159-161
- Garritsen A, van Galen PJ and Simonds WF (1993) The N-terminal coiled-coil domain of beta is essential for gamma association: a model for Gprotein beta gamma subunit interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16):7706-7710.
- Masuh, I., Balaji, S., Muntean, B. S., Skamangas, N. K., Chavali, S., Tesmer, J. J. G., ... Martemyanov, K. A. (2020). A Global Map of G Protein Signaling Regulation by RGS Proteins. *Cell*, 183(2), 503-521.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.052>
- Ibrahim, P., Wifling, D., & Clark, T. (2019). Universal Activation Index for Class A GPCRs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(9), 3938–3945. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00604>
- Rajagopal, Rajagopal, & Lefkowitz, (2010). (Latorraca et al., 2017)
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010). Teaching old receptors new tricks: Biasing seventransmembrane receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(5), 373–386. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>
- Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2011)
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Foon, S. T., Kobilka, T. S., ... Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta$ 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318(5854), 1258–1265. <https://doi.org/10.1126/science.1150577>
- Pierre ADAM, Analyse de l'impact de mutations induites sur la pharmacologie du récepteur GPR27, thèse de Doctorat, Université de Liège ( ), 2021
- Chasse, S. A. and H. G. Dohlman (2003). "RGS proteins: G protein-coupled receptors meet their match." *Assay Drug Dev Technol* 1(2): 357-364.
- McCudden, C. R., M. D. Hains, et al. (2005). "G-protein signaling: back to the future." *Cell Mol Life Sci* 62(5): 551-577.
- VIRGINIA FELOUZIS , Etude du signal AMP cyclique déclenché par la chimiokine CX3CL1 en aval de son récepteur CX3CR1, thèse de Doctorat , université PARIS VI (France), 2015

## Références bibliographiques

---

- Katz A, Wu D and Simon MI (1992) Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360(6405):686-689
- Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D and Clapham DE (1989) G-protein beta gamma subunits activate the cardiac muscarinic K<sup>+</sup>-channel via phospholipase A2. *Nature* 337(6207):557-560..
- Thomas Déséchalliers, Rôle des récepteurs couplés aux protéines Gadrénergiques dans la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques, thèse universite de Rennes 1 ( France),1991
115. Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2005 May 15;142(1-2):94–101.
116. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled Receptors in the human genome form five main families: Phylogenetic analysis, Paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003 Jun;63(6):1256–72.
121. Huang H-C, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 2004;5(7):234.
122. Malbon CC. Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2004 May 1;9:1048–58.
123. Behrens M, Brockhoff A, Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Meyerhof W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jun 25;319(2):479–85.
124. Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2001; 2(12): REVIEWS 3013
- Audet N, La sélectivité fonctionnelle des ligands du récepteur delta opiacé. 2011, Université de Montréal
- Pelé J, 2010, Analyse évolutive des récepteurs couplés aux protéines G, thèse de Doctorat, Université d'Angers (France).
- Mobarec, J. C. & Filizola, M. (2008), 'Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors.' *Expert Opin Drug Discov* 3(3), 343—355 (Pelé, 2010)
- Jean-Luc Galzi, Brigitte Ilien. Les récepteurs couplés aux protéines G : Des régulateurs allostériques du métabolisme cellulaire. *médecine/sciences*, 2012, 28 (10), pp.852-857.

## Références bibliographiques

---

Ref (Nos récepteurs déroulent leur mécanique ! Maxime Louet, Landry Charlier, Jean Martinez et Nicolas Floquet , 'actualité chimique - décembre 2013 - n° 380

Refernce Identification et caractérisation d'un nouveau rôle de la sous-unité G $\alpha$ s au niveau du compartiment endosomal **Par Rosciglione Stéphanie**

**(33) Tuteja, N. (2009), 'Signaling through G protein coupled receptors.', *Plant Signal Behav* 4(10), 942—947.**

Julien Pelé, ANALYSE EVOLUTIVE DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPG), thèse de Doctorat, Angers (France), 2010

O'Brien, J. B., Wilkinson, J. C., & Roman, D. L. (2019). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: Progress and future potentials. *Journal of Biological Chemistry*, 294(49), 18571–18585. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007060>

[Aurélien Grosdidier 2007, .Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. THÈSE de doctorat , Univeristé de Grenoble (France).

Rendez .G, 2010, Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking, thèse de Doctorat , UNIVERSITÉ DE TOULOUSE ( France).

65. Halle, B., 2002, Flexibility and Packing in Proteins., *PNAS*, Vol. 99, pp3. 1274-1279.

66. Gruebele M, Schulten K, 2008 Ten-Microsecond Molecular Simulation of a Fast-Folding WW Domain. *Freddolino P L, Liu F, , Biophys. J.*, Vol. 94, pp. 75-77.

67. Derreumaux P, Mousseau N. 2, 2007, J. Coarse Grained Protein Molecular Dynamics Simulations. *Chem. Phys.*, Vol. 126.

68. Marrink S J, Risselada H J, Yefimov S, Tieleman D P, de Vries A H. 27, 2007, J. The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *Phys. Chem. B*, Vol. 111, pp. 7812-7824.

69. Brooks B, Karplus M. 1985 Normal Modes for Specific Motions of Macromolecules: Application to the Hinge-Bending Mode of Lysozyme., *PNAS*, Vol. 82, pp. 4995-4999.

70. Hayward S, Kitao A, Berendsen H J C. 1997, Model-Free Methods of Analyzing Domain Motions in Proteins from Simulation: A comparison of Normal Mode Analysis and Molecular Dynamics Simulation of Lysozyme. *Proteins*, Vol. 27, pp. 425-437.

71. Tama F, Gadea F X, Marques O, Sanejouand Y H. 2000, Building-Block Approach for Determining Low Frequency Normal Modes of Macromolecules. , *Proteins*, Vol. 41, pp. 1-7.

72. D, Gabow H N. 2000, Protein Domain Decomposition Using a Graph-Theory Approach. *Xu Y, Xu Bioinformatics*, Vol. 16, pp. 1091-1104.

## Références bibliographiques

---

73. Wriggers W, Schulten K. 1997, Protein Domain Movements: Detection of Rigid Domains and Visualisation of Hinges in Comparisons with Atomic Coordinates. *Proteins*, Vol. 29, pp. 1-14.
74. Alexandrov N, Shindyalov I. 2003, PDP: Protein Domain Parser. *Bioinformatics*, Vol. 19, pp. 429-430.
75. Gerstein M, Krebs W. 1998, A Database of Macromolecular Motions. *Nucl. Acid Res.*, Vol. 26, pp. 4280-4290.
76. Guieysse D, Remaud-Siméon M, Tran V. 2005, A Path Planning for Computing Large Amplitude Motions of Flexible Molecules. Cortés J, Siméon T, Ruiz de Angulo V, *Bioinformatics*, Vol. 21, pp. 116-125.
77. Bastard K, Thureau A, Lavery R, Prévost C. 2003, Docking Macromolecules with Flexible Ligands. *J. Comp. Chem.*, Vol. 24, pp. 1910-1920.
78. Yun M R, Lavery R, Mousseau N, Zakrzewska K, .. 2006, Derreumaux P ARTIST: an Activated Method in Internal Coordinate Space for Sampling Protein Energy Landscapes *Prot. Struct. Gen. Bioinfo.*, Vol. 63, pp. 967-975.
79. Barkema G T, Mousseau N. 1996, Event-Based Relaxation of Continuous Disordered Systems. *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 77, pp. 4358-4361.
80. Bahar I, Atilgan A R, Erman B. 1997, Direct Evaluation of Thermal Fluctuations in Proteins Using a Single Parameter Harmonic Potential. *Fold. Des.*, Vol. 2, pp. 173-181.
- [Aurélien Grosdidier 2007, .Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. THÈSE de doctorat , Univeristé de Grenoble (France).
- Renvez .G, 2010, Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking, thèse de Doctorat , UNIVERSITÉ DE TOULOUSE ( France).
- [67] - Fox, S.; Wang, H.; Sopchak, L.; Khoury, R 2001,. High throughput screening: early successes indicate a promising future. *J. Biomol. Screen.*, 6 (3), 137-140.
- [69] - Munos, B, 2009. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discovery*, , 959-968.
- [70] - Hajduk, P. J.; Galloway, W. R.; Spring, D. R, 2011. Drug discovery: A question of library design. *Nature*, 470 (7332), 42-43.
- [71] - Bohacek, R.; McMartin, C.; Guida, W, 1996. The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Med. Res. Rev.*, , 16 (1), 3-50.

## Références bibliographiques

---

- [72] - Borsi, V.; Calderone, V.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Sarti, N., 2010. Entropic contribution to the linking coefficient in fragment based drug design: A case study. *J. Med. Chem.*, 53 (10), 4285- 4289
37. Gershel, A, 1995. Liaison intermoléculaires. [ed.] InterEditions/CNRS Editions. s.l. : Savoirs Actuels.
38. Milburn D, Gerstein M. 2004, Conformational Changes Associated with Protein-Protein Interactions. Goh C S, *Curr. Op. Struct. Biol.*, Vol. 14, pp. 104-109.
39. Tokuriki N, Tawfik D S 2009, Protein Dynamism and Evolvability. . 203, *Science*, Vol. 324, pp. 203-207.
40. Langmuir, I. 1991, The Arrangement of Electrons in Atoms and Molecules. *JACS*, Vol. 41, pp. 868-934.
41. Clark, J, 2009. Edexcel IGCSE CHEMISTRY Syllabus. s.l. : Pearson.
42. Jahn T R, Radford S E. 2008, Folding versus Aggregation: Polypeptide conformations on Competing Pathway. *Biochem. and Biophys.*, Vol. 468, pp. 100-117.
43. Helms, V. 2007, Protein Dynamics Tightly Connected to the Dynamics of Surrounding and Internal Water Molecules. *ChemPhysChem*, Vol. 8, pp. 23-33.
44. Freindorf M, Shao Y, Furlani T R, Kong J. 12, 2005, Lennard-Jones Parameters for the Combined QM/MM Method using the B3LYP/6-31G\*/AMBER Potential. *J. Comp. Chem.*, Vol. 26, pp. 1270-1278.
45. Isaacs E D, Shukla A, Platzman P M, Hamann D R, Barbielleini B R, Tulk C A. 1999, Covalency of the Hydrogen Bond in Ice: A direct X-Ray Measurement. *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 82, pp. 600-603.
46. Pauling L, Corey R B. 1951, Configurations of Polypeptide Chains with Favoured Orientations Around Single Bonds: Two Pleated Sheets. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, Vol. 37, pp. 729-740.
47. Berman H M, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T N, Weissig H, Shindyalov I N, Bourne P E. 2000, The Protein Databank. *Nucl. Ac. Res.*, Vol. 28, pp. 235-242.

