



UNIVERSITÉ  
DE NAMUR

University of Namur

# Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

## THESIS / THÈSE

### DOCTEUR EN SCIENCES

#### Influence des lipides de la membrane plasmique sur la structure et la fonction du récepteur opioïde $\mu$ par dynamique moléculaire gros grains

Angladon, Marie-Ange

*Award date:*  
2019

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITÉ  
DE NAMUR

FACULTÉ  
DES SCIENCES

Département de Chimie

# Influence des lipides de la membrane plasmique sur la structure et la fonction du récepteur opioïde $\mu$ par dynamique moléculaire gros grains

Dissertation présentée par **Marie-Ange Angladon**  
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

## **Composition du Jury**

Docteur Frédéric Kerff (Université de Liège)  
Professeur Martine Prévost (Université Libre de Bruxelles)  
Docteur Laurence Leherte (Université de Namur)  
Professeur Carine Michiels (Université de Namur)  
Professeur Daniel Vercauteren (Université de Namur, promoteur)  
Professeur Johan Wouters (Université de Namur, président)



# Remerciements

Exercice traditionnel néanmoins difficile, voici venu le temps des remerciements.

Merci au Jury d'avoir pris le temps de lire, de s'interroger et de décortiquer ce travail : Pr. Daniel Vercauteren, Pr. Carine Michiels, Pr. Martine Prévost et Dr. Laurence Leherte. Merci Pr. Aatto Laaksonen d'avoir participé au comité d'accompagnement de cette thèse.

Merci Daniel de m'avoir laissé cette grande autonomie qui est votre marque de fabrique. J'ai apprécié d'avoir cette liberté de recherche pour explorer différentes possibilités tout en sachant que je devais aussi produire des résultats. Merci Laurence pour les innombrables relectures du premier article qui n'en finissait pas de s'améliorer et de se compléter. Nicolas, Aymeric, Mathieu, Pierre, Robin, Justine, Maïssa merci pour votre présence au cours de ces années.

Accepter une thèse à l'étranger (dans le grand Nord), c'est aussi perdre une partie de son identité et accepter de la renouveler en créant des liens. On n'oublie pas ceux qui restent et je remercie chaudement ma famille et mes amis restés à Toulouse ou ailleurs. J'ai eu l'occasion d'agrandir ma famille et mon cercle d'amis. Merci à vous tous, Aurore, Laurent, Jean-Luc, Marie, Loïc, Pierre, Jean et Orian. L'unité UCPTS est réputée pour son ambiance où les collègues sympas se succèdent, Céline, Annaëlle, Marc, Kornelia, Julia, Audrey, Conrard, Sébastien, Laurie, Mégane, Thomas, Quentin, Khalina, Elise.

Le laboratoire LCT m'a tout particulièrement fait une place pour finir la thèse entourée de collègues tous agréables et certains plus bavards que je ne le soupçonnais en début de thèse mais quel plaisir. Merci pour ces heures à bavarder de tout et de rien où j'apprenais à comprendre la Belgique au passage.

Finir la thèse avec un nouveau travail qui commence, c'est un beau challenge. Je suis heureuse de l'avoir relevé et de le finir maintenant. Merci à tous mes collègues, Justine, Céline, Aline, Vinciane, Charles, Jean-Paul, Stéphanie, Olivia, Jonathan, Maxime, Maureen et Isabelle. Avec plusieurs docteurs dans l'équipe, c'était un support bien agréable.

On garde toujours le meilleur pour la fin, merci Frédéric de m'avoir accompagnée et supportée tout le long de ce travail et de nous avoir offert un bonus, Eléonore.

Car si la thèse est enrichissante intellectuellement, un enfant vous enrichit humainement et l'ensemble vous fait grandir.

Merci à tous ceux qui ont été impliqués de près ou de loin dans cette belle aventure qu'est la thèse.

Université de Namur  
Faculté des Sciences  
Rue de Bruxelles, 61 – 5000 Namur, Belgique

## Influence des lipides de la membrane plasmique sur la structure et la fonction du récepteur opioïde $\mu$ par dynamique moléculaire gros grains

Par Marie-Ange Angladon

### Résumé

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur les interactions entre le récepteur opioïde  $\mu$  ( $\mu$ OR) et les lipides de la membrane plasmique, en particulier, les phospholipides et le cholestérol. Afin d'étudier l'impact des lipides sur la structure et la fonction de  $\mu$ OR, nous avons utilisé la dynamique moléculaire classique (DM) tout-atomes (TA) et gros-grains (GG).

Les résultats sont séparés en deux chapitres qui montrent les analyses réalisées pour les membranes simples d'une part et les membranes combinées avec le cholestérol d'autre part.

Les études sont basées principalement sur quatre analyses :

- La mesure de l'angle *tilt* de chaque hélice pour l'analyse structurale de  $\mu$ OR ;
- Le nombre de contacts entre  $\mu$ OR et chaque grain des lipides pour comprendre l'impact de leur structure sur les interactions protéine-lipides ;

- Le nombre de contacts entre les lipides et chaque acide aminé (AA) de la protéine afin de localiser les AAs qui interviennent majoritairement dans les interactions  $\mu$ OR-lipides ;
- Le réseau de déplacements des lipides autour de la protéine pour identifier les sites tridimensionnels (3D) de  $\mu$ OR qui accueillent un lipide et de leur fréquence de déplacements.

Les résultats issus du premier chapitre sur l'étude du récepteur dans des membranes simples montrent que la nature de la tête du lipide (choline ou éthanolamine dans ce travail) impacte indirectement les interactions  $\mu$ OR-lipides par l'encombrement stérique de la tête lipidique sur la chaîne acyle localisée sous sa tête en diminuant le nombre d'interactions pour la choline par rapport à l'éthanolamine. Le nombre de contacts augmente ensuite de la même manière pour les phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines insaturées. Enfin, les phosphatidylcholines saturées forment une membrane plus rigide, ce qui contraint la protéine, augmente le nombre de contacts  $\mu$ OR-lipides et diminue le nombre de conformations différentes de  $\mu$ OR. Il faut noter que la partie de la protéine localisée du côté intracellulaire de la membrane est moins mobile que du côté extracellulaire où est localisée la poche du ligand. Enfin, les sites connus d'oligomérisation (H1/H2/H8 et H5/H6) sont aussi des sites d'interactions faibles avec les lipides, sachant que les interactions protéine-lipides favorisent la dimérisation pour d'autres récepteurs aux protéines G (RCPGs).

Le deuxième chapitre de notre travail de thèse porte sur les membranes avec 30 % de cholestérol. Les membranes sont donc plus rigides, ce qui augmente le nombre de contacts  $\mu$ OR-lipides. On remarque dans un premier temps que les phospholipides ne sont pas en compétition avec le cholestérol ; les profils

d'interaction avec la protéine sont inchangés. Les sites identifiés pour le cholestérol, de manière théoriques et connus de la littérature (CARC et CRAC) sur une hélice, ne sont pas suffisants pour décrire les sites d'interactions du cholestérol à la surface de  $\mu$ OR. Pour cela, la méthode présentant le réseau de déplacement des lipides permet une analyse plus fine au niveau 3D. Nous mettons ainsi en évidence un site localisé sur trois hélices qui respecte la construction des sites CARC/CRAC. De la même manière que pour les phospholipides, le cholestérol est connu pour favoriser la dimérisation des RCPGs et affecte leur fonction et leur localisation dans la membrane.

Signalons au lecteur que les références générales sont présentées à la fin du manuscrit. Les deux chapitres de résultats, basés sur deux publications, ont leurs références.





# Liste des abréviations

3D : tridimensionnel

AA : acide aminé

$\beta$ 2arr :  $\beta$ 2-arrestine

CCh : POPC + 30 % de cholestérol

CARC : cholesterol amino acid recognition/interaction consensus sequence

CHARMM : Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

Chol : cholestérol

CRAC : cholesterol recognition/interaction amino acid consensus sequence

DCh : DPPC + 30 % de cholestérol

DM : dynamique moléculaire

DPPC : 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

ECh : POPE + 30 % de cholestérol

ECL : extracellular loop

Ext : externe

GDP : guanosine diphosphate

GG : gros-grains

GSL : glycosphingolipide

GROMACS : Groningen machines for chemical simulations

GTP : guanosine triphosphate

Hi : hélice i

IASP : International Association for the Study of Pain

ICL : intracellular loop

Int : interne

NAMD : NANoscale Molecular Dynamics

MARTINI : MARrink's Toolkit INitiative

OMS : Organisation mondiale de la santé

PC : phosphatidylcholine

PE : phosphatodyléthanolamine

PI : phosphatidylinositol

PS : phosphatidylsérine

PDB : Protein Data Bank

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

SM : sphingomyéline

TA : tout-atomes

Tm : transition de phase

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SM : sphingomyéline

TM : transmembrane helix

UNODC : United Nations Office on Drugs and Crime

$\mu$ OR :  $\mu$  opioid receptor

VMD : Visual Molecular Dynamics

# Abréviation des 20 acides aminés des protéines

A : alanine

C : cystéine

D : acide aspartique

E : acide glutamique

F : phénylalanine

G : glycine

H : histidine

I : isoleucine

K : lysine

L : leucine

M : méthionine

N : asparagine

P : proline

Q : glutamine

R : arginine

S : sérine

T : thréonine

V : valine

W : tryptophane

Y : tyrosine

# Table des matières

INTRODUCTION.....	17
1. La douleur .....	19
2. Les récepteurs opioïdes .....	22
2.1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	22
2.2. Le récepteur opioïde $\mu$ .....	32
2.3. Complexes de récepteurs opioïdes.....	37
3. La membrane .....	43
3.1. Fonctions.....	43
3.2. Composition .....	44
3.3. Structure .....	49
4. Interactions protéines-membrane .....	52
4.1. Généralités .....	52
4.2. Les RCPGs et les lipides .....	54
4.3. Les récepteurs opioïdes et la membrane.....	60
Objectifs .....	67
METHODES .....	71
1. Systèmes moléculaires .....	73
2. Conversion du tout-atomes en gros-grains.....	75
3. Simulations de dynamique moléculaire .....	78

4. Méthodes d'analyses.....	81
RESULTATS.....	87
Chapitre 1 : Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the $\mu$ opioid receptor: A coarse-grained molecular dynamics study .....	89
1. Abstract.....	91
2. Introduction .....	92
3. Materials and methods .....	95
3.1. Molecular systems .....	95
3.2. Molecular Dynamics simulations.....	97
3.3. Analysis methods .....	97
4. Results .....	99
4.1. Comparison between AA and CG methods.....	99
4.2. Tilt angle of the $\mu$ OR helices .....	102
4.3. Effect of the lipid structure on the number of interactions with the $\mu$ opioid receptor .....	104
4.4. Interaction profiles between POPC, POPE, and DPPC models and $\mu$ OR	107
4.5. Lipid exchange in their sites at the protein surface .....	112
5. Conclusions and discussion.....	119
Chapitre 2 : Cholesterol sites at the surface of the $\mu$ opioid receptor: a coarse-grained molecular dynamics study.....	131
1. Abstract.....	134

2.	Introduction.....	134
3.	Materials and methods.....	137
3.1.	Molecular systems .....	137
3.2.	Molecular Dynamics simulations.....	139
3.3.	Analysis methods .....	140
4.	Results .....	141
4.1.	Tilt angle of the $\mu$ OR helices.....	141
4.2.	Protein-lipid interactions.....	143
4.3.	Contact map of cholesterol and phospholipids .....	145
4.4.	Lipid movements at the $\mu$ OR surface .....	152
5.	Conclusion and discussion .....	160
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	169
	BIBLIOGRAPHIE GENERALE .....	181







# INTRODUCTION



## 1. La douleur

La douleur est une punition divine. La personne qui souffrait était invitée à réguler elle-même l'intensité du mal. La notion de stoïcité apparaît avec Sénèque dès le 1<sup>er</sup> siècle. Il faut attendre la Renaissance et Ambroise Paré au XVI<sup>e</sup> siècle pour que la douleur soit traitée comme une part de la maladie.

L'Association internationale pour l'étude de la douleur (IASP pour *International Association for the Study of Pain*) définit la douleur de la manière suivante : « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans ces termes ». C'est donc une sensation qui dépend uniquement du patient, difficile à la fois à quantifier et à qualifier. De plus, nous ne sommes pas tous sensibles à la douleur de la même manière (Pasternak, 2010) ; une femme et un homme, par exemple, ne ressentiront pas la douleur de la même manière (Chartoff et Mavrikaki, 2015 ; McEwen et Milner, 2017).

Plusieurs composés ont été utilisés au cours des siècles pour soulager la douleur, tels que l'éther, l'opium ou le laudanum. La disparition de la douleur est aussi associée au sommeil, à l'oubli et aux effets psychotropes.

Les Sumériens, environ 3000 ans avant Jésus-Christ, décrivent sur une tablette le pavot à opium comme la plante de la joie. Dans l'Égypte Antique, un des usages, que nous ne recommandons pas, était de verser quelques gouttes d'opium dans la bouche des bébés pour calmer leurs pleurs. On en retrouve la mention dans le papyrus d'Ebers, environ 1552 avant Jésus-Christ, qui représente l'un des plus anciens traités médicaux. Le dieu des songes de la mythologie grecque, Morphée, donne son nom à un médicament : la morphine. Celle-ci peut être transformée en

un opiacé synthétique qui fait l'objet d'un trafic illicite, l'héroïne, une des drogues les plus connues.

Les drogues sont caractérisées par une tolérance et une dépendance à leur consommation (Badiani *et al.*, 2018). La dépendance induit un état de manque qui doit être comblé par une consommation régulière. La tolérance est liée à l'accoutumance à la dose prise ; il est donc nécessaire d'augmenter les doses pour obtenir les mêmes sensations (Badiani *et al.*, 2011). Ces drogues utilisent les circuits du plaisir qui existent dans notre corps.

L'opium donne son nom aux récepteurs qui contrôlent la douleur dans notre corps : les récepteurs opioïdes. Le marché illicite des opiacés représente 16 millions de personnes dans le monde, soit 236 320 ha de culture du pavot à opium, dont 75 % en Afghanistan. Ce sont les drogues les plus nocives selon l'Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime (UNODC pour *United Nations Office on Drugs and Crime*), avec 70 % d'impact négatif sur la santé.

La frontière entre un médicament et une drogue est ténue puisque chaque pays est libre d'autoriser ou non le libre commerce des composés opioïdes. On distingue trois classes de médicaments analgésiques selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), de 1 à 3. La classe 1 est la plus faible et commercialisée et la classe 3, la plus forte et soumise à une surveillance accrue du fait des risques de dépendance et de surdosage.

Des molécules de classe 3, comme l'oxycodone et l'hydrocodone sont considérées comme des stupéfiants en France et elles ne sont prescrites que sur ordonnances sécurisées de 28 jours. De même la prescription et la consommation de codéine,

de classe 2, est très surveillée en France. *A contrario* aux Etats-Unis, depuis les années 2000, les règles de prescription des opioïdes se sont assouplies, ce qui a entraîné une augmentation brutale de leur consommation et une crise sanitaire depuis le milieu des années 2010 (Trang et al., 2015).

Notre corps synthétise naturellement des équivalents aux opiacés, des peptides endogènes qui interagissent avec les récepteurs opioïdes, classés en trois types :  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ . Ils sont synthétisés dans notre cerveau et ils présentent deux avantages : ils ne créent ni tolérance, ni dépendance à la dose et il n'y a pas d'effets secondaires (Feng et al., 2012). Malheureusement, ces peptides tels les endorphines, enképhalines, dynorphines et endomorphines, ne sont pas de bons médicaments potentiels (Przewłocki et Przewłocka, 2001 ; Williams et al., 2013 ; Olson et al., 2017). En effet, ils manquent généralement de sélectivité par rapport aux trois types de récepteurs (à l'exception de la dynorphine pour le récepteur  $\kappa$ ) ; ils ont une durée de demi-vie courte, une faible pénétration de la barrière hémato-encéphalique et une faible biodisponibilité (Olson et al., 2017).

L'efficacité des médicaments de type opioïdes contrebalance les nombreux effets secondaires, tels que l'hyperalgésie (augmentation de la sensibilité à la douleur), des nausées, des vomissements, la détresse respiratoire (Benyamin et al., 2008 ; Law et al., 2013 ; Trang et al., 2015). Dans ce contexte, il est crucial de mieux comprendre le mécanisme d'activation des récepteurs à la douleur qui feront l'objet de la prochaine partie de notre Introduction.

## 2. Les récepteurs opioïdes

### 2.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs opioïdes font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui sont caractérisés par sept hélices transmembranaires situées dans la membrane plasmique des cellules humaines (Stevens *et al.*, 2013).

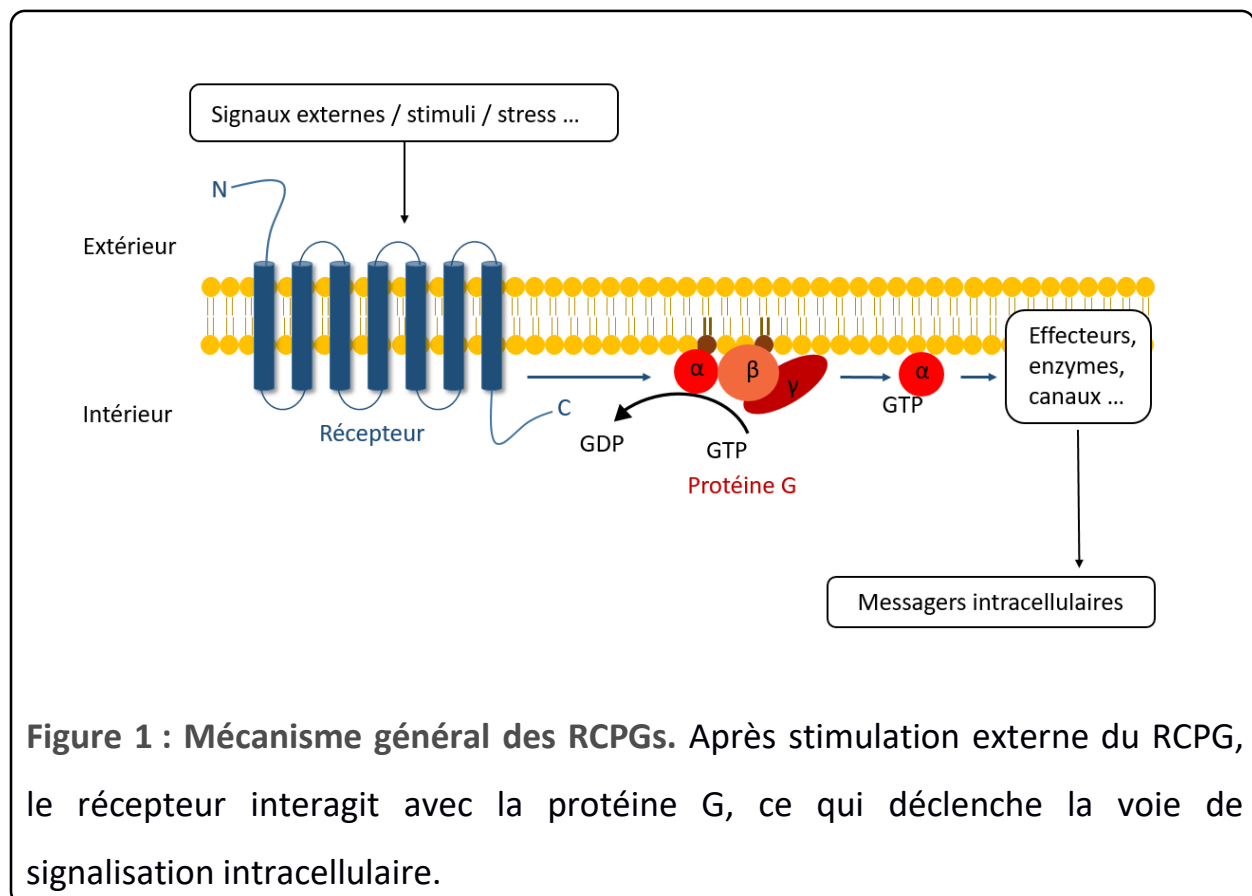
Il existe plus de 800 RCPGs différents qui sont classés en cinq familles : la rhodopsine pour la classe A, la sécrétine pour la classe B, les RCPGs adhésion et glutamate pour la classe C et les RCPGs frisés/lisses pour la classe F (Jacoby *et al.*, 2006 ; Katrich *et al.*, 2012). Les différentes familles ont ensuite été divisées en sous-familles sur base de leur similarité de séquence (Stevens *et al.*, 2013). Les récepteurs opioïdes font partie de la classe A représentée par la rhodopsine.

Les récepteurs peuvent être activés par une grande variété de molécules, allant des molécules odorantes aux hormones, en passant par des gaz, des lipides ou des peptides (Fanelli et De Benedetti, 2011). Cette grande diversité d'activation des ligands explique par ailleurs pourquoi ils représentent 3,4 % du génome humain (Bockaert et Pin, 1999; Gershengorn et Osman, 2001). De plus, le mécanisme d'activation général est commun à tous les RCPGs.

Dans le cas des récepteurs opioïdes, l'activation se fait en réponse au signal de la douleur. L'activation des nocicepteurs, situés dans l'ensemble du corps, est directe (mécanique, chimique et thermique) ou indirecte par l'intermédiaire d'une substance chimique (ion H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ...). Le message nerveux est ensuite transmis au cerveau dans trois aires : le cortex somatosensoriel, le cortex cinglé antérieur et le cortex insulaire (Fields et Margolis, 2015). Les endorphines

sécrétées par les neurones pré-synaptiques vont ensuite activer les récepteurs opioïdes situés dans les neurones post-synaptiques.

Après activation du récepteur par le ligand (endorphines, drogues ou médicaments), le récepteur se déplace dans la membrane pour interagir avec la protéine G intracellulaire, composée de trois sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (**Figure 1**) et il est inséré dans la membrane par une ancre lipidique. La guanosine triphosphate (GTP), située sur la protéine G, est transformée en guanosine diphosphate (GDP) et l'énergie libérée est utilisée pour libérer la sous-unité  $G\alpha$  qui va ensuite déclencher la cascade de signalisation cellulaire (Minh Duc *et al.*, 2015). Le mécanisme pour le récepteur opioïde qui nous intéresse plus particulièrement sera détaillé plus tard dans le texte.



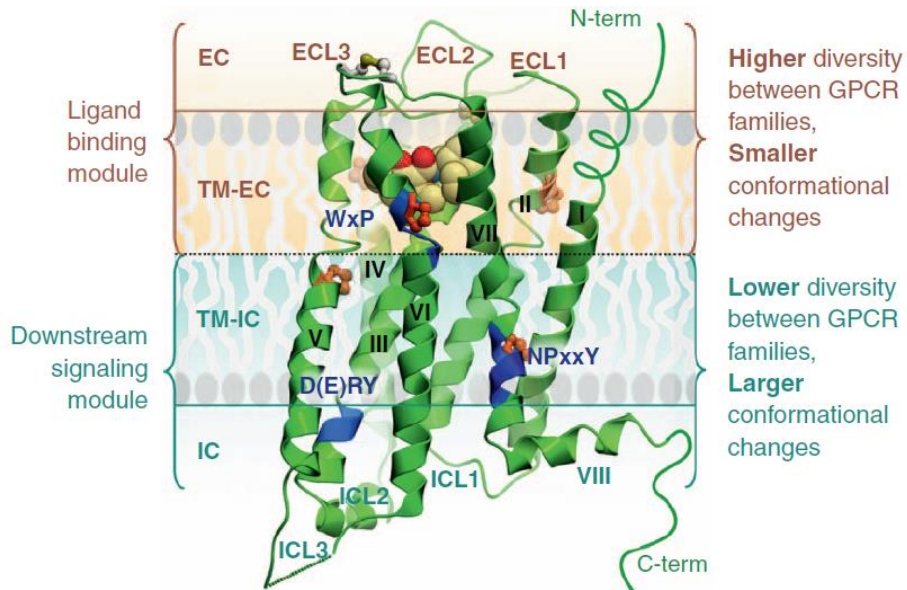


La partie N-terminale du récepteur est située dans l'espace extracellulaire et la partie C-terminale dans le cytoplasme (**Figures 1 et 2**). La structure commune à tous les RCPGs est composée de 7 hélices transmembranaires (TM pour *transmembrane helix*) avec une hélice 8 (H8) intracellulaire séparée par 3 boucles intracellulaires (ICL pour *intracellular loop*) et 3 boucles extracellulaires (ECL pour *extracellular loop*). La protéine G interagit principalement avec la boucle ICL3 et la partie C-terminale (Audet et Bouvier, 2012 ; Minh Duc *et al.*, 2015).

Selon la famille du récepteur, H8 est présente ou non, et si elle est présente elle a une taille variable (Huynh *et al.*, 2009). Elle participe aux interactions avec les lipides de la membrane plasmique, en particulier les acides gras. Elle interagit aussi avec d'autres protéines de la membrane mais son rôle reste encore à élucider (Yeagle et Albert, 2007).

Il existe plusieurs motifs communs dans les séquences des RCPGs (**Figure 2**). Le motif D(E)RY est présent dans l'hélice H3 et forme un pont ionique avec la partie cytosolique de l'hélice H6. La courbure de l'hélice H5, induite par une proline, sépare l'hélice en deux parties inégales : 1/3 (extracellulaire) et 2/3 (intracellulaire).

Les séquences WxP de l'hélice H6 et NPxxY de H7 jouent un rôle dans l'activation des RCPGs (Zhang *et al.*, 2015). Le tryptophane, de la séquence WxP, interagit avec les agonistes et induit un mouvement de H6, ce qui est considéré comme l'élément déclencheur marquant pour l'activation des RCPGs (Park *et al.*, 2008). La tyrosine, du motif NPxxY, fait face à l'intérieur de la protéine et elle empêche le mouvement de H7 vers H3, ce qui inactive le récepteur (Park *et al.*, 2008).



**Figure 2 : Structure et modularité des RCPGs.** L'exemple concerne le récepteur D3R (PDB : 3PBL) de la classe A. Les hélices sont numérotées par des chiffres romains. Les différents motifs communs aux RCPGs sont : ECL (boucle extracellulaire), ICL (boucle intracellulaire), TM-EC (partie extracellulaire des hélices) et TM-IC (partie intracellulaire des hélices). Katrich *et al.*, 2012.

Les protéines membranaires et les RCPGs en particulier ont souvent en commun deux séquences particulières : les séquences CRAC (Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence) et CARC (Cholesterol Amino acid Recognition/interaction Consensus sequence) liées aux interactions avec le cholestérol (Fantini et Barrantes 2013 ; Fantini *et al.*, 2016) (**Figure 3**).

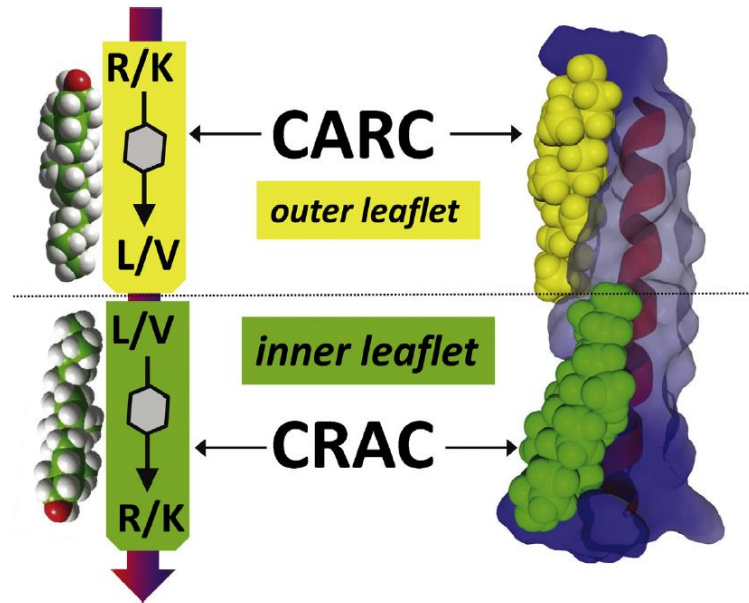


Figure 3 : Sites miroirs pour les séquences CARC et CRAC. On trouve généralement ces séquences distribuées en miroir avec la séquence CARC dans la couche externe et CRAC dans la couche interne. [Fantini et al., 2016](#).

La séquence d'acides aminés (AA) de CRAC est composée de (L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)-X<sub>1-5</sub>-(K/R) du N- au C-terminal. La leucine et la valine, puis la lysine et l'arginine sont interchangeableables en fonction des protéines. La tyrosine est toujours présente dans la séquence CRAC car elle est nécessaire pour les interactions avec le cholestérol et ne peut pas être remplacée par un autre AA ([Fantini et Barrantes, 2013](#)) ; cela a été caractérisé par des expériences de mutagenèse dirigée en contrôlant les interactions avec le cholestérol ([Li et Papadopoulos, 1998](#)). La séquence a été établie en comparant les structures primaires de vingt protéines qui interagissaient avec du cholestérol et dont le site précis d'interaction était connu. La séquence d'AAs est importante pour observer une interaction entre la protéine et le cholestérol mais pas seulement. Il faut aussi que le premier résidu,

côté C-terminal, soit lysine/arginine, soit localisé à l'interface lipide/eau pour assurer une interaction optimale avec les lipides. La leucine ou la valine interagissent avec la chaîne latérale hydrophobe du cholestérol et la tyrosine avec la tête polaire (Li et Papadopoulos, 1998). Enfin, comme on peut le voir à la **Figure 3**, les séquences CRAC sont orientées dans les hélices transmembranaires et interagissent préférentiellement dans la couche cytoplasmique de la membrane plasmique.

Les séquences CRAC et CARC sont le miroir l'une de l'autre par l'axe de symétrie qui divise la membrane transversalement (Fantini *et al.*, 2016). Les séquences sont donc diamétralement opposées du N- au C-terminal pour CARC : (K/R)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)-X<sub>1-5</sub>-(L/V). L'AA au milieu de la séquence n'est pas obligatoirement une tyrosine et peut être remplacée par une phénylalanine (Fantini et Barrantes, 2013). Dans la séquence CRAC, la tyrosine forme une liaison hydrogène avec le groupe OH du cholestérol, ce qui n'est pas possible avec la phénylalanine. Pour la séquence CARC, l'interaction est réalisée par des liaisons  $\pi$  entre le cycle aromatique de l'AA et le cycle stérane du cholestérol, l'interaction se faisant complètement dans la partie apolaire de la membrane.

Il faut noter que ces séquences prédites théoriques ne semblent pas toutes correspondre à la réalité puisqu'elles sont situées uniquement sur une hélice. Une séquence CRAC ou CARC peut être à cheval entre une hélice transmembranaire et une boucle et ne pas sembler cohérente avec les interactions polaires et apolaires. La partie apolaire de la séquence dépasse, par exemple, dans le milieu aqueux. Pour autant, les boucles ne sont pas systématiquement en dehors de la

protéine et forment aussi des invaginations dans la membrane, ce qui permet les interactions protéine/cholestérol.

De plus, on remarque aussi que les sites CRAC et CARC ne sont pas linéaires dans la membrane et forment des sites tridimensionnels (3D), c'est-à-dire des poches à la surface de la protéine qui accueillent les lipides entre plusieurs hélices. Cette hypothèse a été formulée par Fantini et Barrantes en 2013. La résolution et la caractérisation de ces sites sont particulièrement difficiles puisqu'ils sont localisés entre plusieurs hélices.

La partie extracellulaire des hélices est impliquée dans la reconnaissance protéine/ligand. Les récepteurs opioïdes peuvent accueillir un grand nombre de ligands grâce aux variations de séquence de la structure primaire et ils sont peu sélectifs. Les boucles présentes dans la partie extracellulaire possèdent une plus grande amplitude de mouvements nécessaire pour l'activation des récepteurs par la protéine G (Katrich *et al.*, 2012).

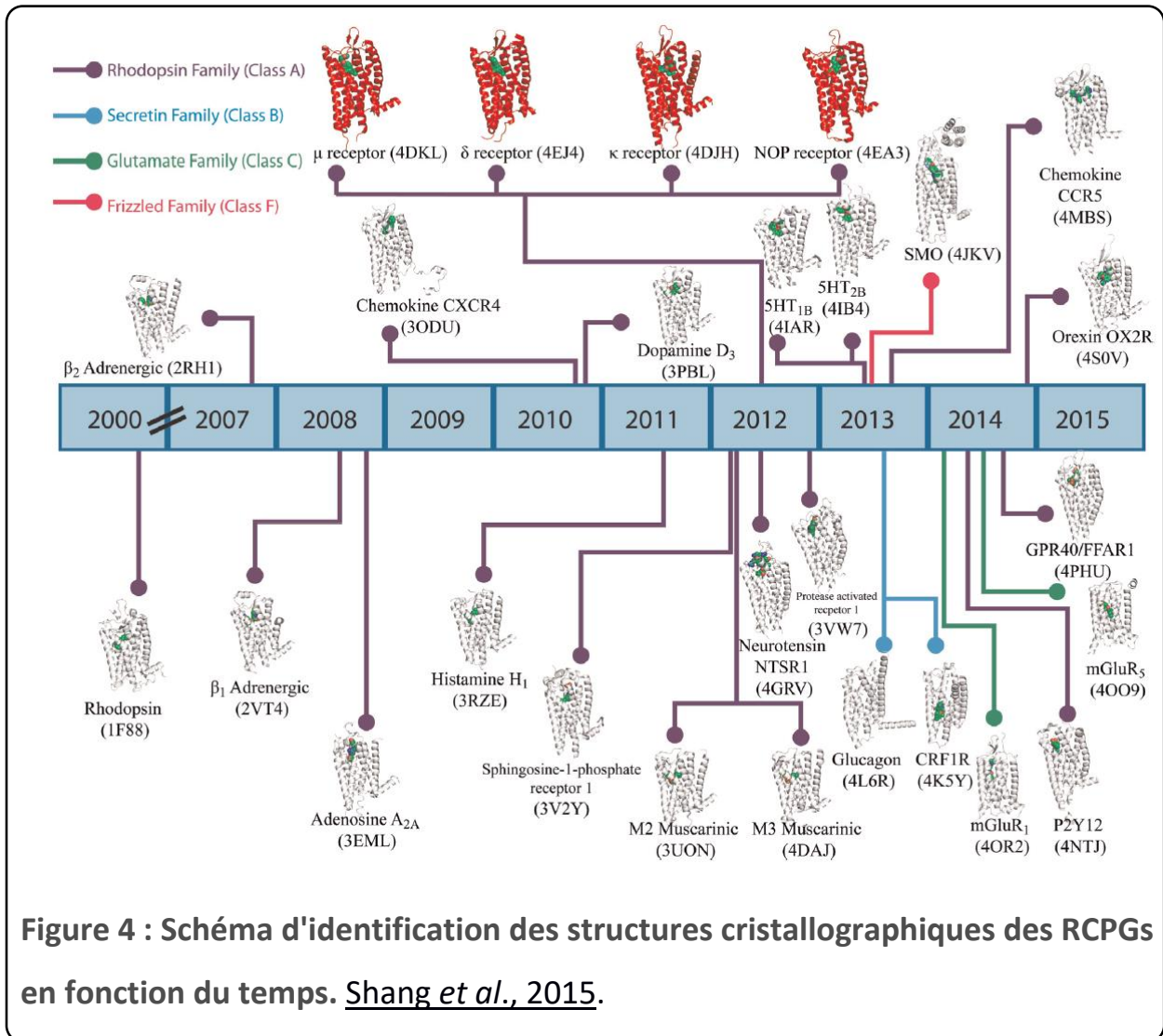
Un ligand peut interagir dans différents sites : dans la partie extracellulaire exposée, on trouve le site principal, orthostérique, avec une poche plus ou moins profonde selon la classe du ligand. Les sites annexes, allostériques, situés en périphérie du site orthostérique, sont présents dans un grand nombre de récepteurs (Jacobson, 2015). Ces sites allostériques peuvent être plus sélectifs que le site principal car ils conservent toujours une légère activité. Ils constituent de bons sites potentiels pour les ligands bitopiques car ils atténuent les effets secondaires après l'activation du mécanisme de réponse à la douleur (Zhang *et al.*, 2015).

Pour mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre le ligand et le récepteur, il est nécessaire de connaître la structure de chacun des partenaires. Une méthode de choix est la cristallographie aux rayons X qui permet d'obtenir une structure 3D atomique statique des protéines (Jacobson, 2015), alors que celles-ci présentent une certaine mobilité. Pour avoir plus d'informations sur leurs mouvements, il convient plutôt d'utiliser la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Il y a quelques années encore, cette méthode n'était pas utilisable du fait de la taille du récepteur et de la préparation difficile des échantillons : expression de la protéine, étiquetage des isotopes et purification (Kobilka et Schertler, 2008). Depuis peu, les études RMN ont par exemple permis d'appréhender la modulation dynamique de la chaîne latérale du ligand du récepteur à l'adénosine  $A_{2A}$  en comparant un agoniste, un agoniste partiel et un agoniste inverse (Clark et al., 2017).

Dans le cas d'une protéine cytosolique, l'extraction et la purification sont faciles car la structure est conservée dans un milieu aqueux. Pour une protéine membranaire, telles que les RCPGs, l'extraction dénature les protéines en les délipidant. De plus, la boucle intracellulaire 3 (ICL3) est très mobile, ce qui gêne la cristallisation. Ainsi, pour les RCPGs, un nouveau protocole a été mis au point par Kobilka et Schertler en 2008 pour cristalliser les RCPGs en bloquant la boucle ICL3. Plus particulièrement, le protocole inclut l'ajout d'une sous-unité du T4 lysosyme qui cristallise facilement à la place d'un petit nombre d'AAs de la boucle. On guide donc la cristallisation des RCPGs artificiellement en stabilisant la boucle ICL3 et en

stabilisant les interactions entre les hélices H5 et H6, ce qui augmente la surface polaire d'interaction disponible pour la cristallisation (Kobilka et Schertler, 2008).

Dans la partie Méthodologie, nous détaillerons le protocole réalisé pour obtenir la structure entière de la protéine  $\mu$ . De nouvelles structures cristallographiques sont ainsi apparues. Elles permettent de mieux comprendre le mécanisme général d'activation des RCPGs, tel que celui du complexe agoniste-récepteur  $\beta_2$  adrénergique-protéine Gs, qui a permis d'analyser les différences structurales induites par la protéine G avec le large déplacement de l'hélice H6 (Rasmussen *et al.*, 2011). Depuis, 2012, on a assisté à une explosion de publications de structures cristallographiques des RCPGs seuls (Audet et Bouvier, 2012 ; Shang *et al.*, 2015) **(Figure 4)**.



La première structure cristallographique de la rhodopsine a été obtenue en 2000 et il a fallu attendre sept ans pour cristalliser la  $\beta_2$ -adrénergique (**Figure 4**). Ces deux récepteurs formeront pendant cinq à dix ans les deux modèles de choix pour la modélisation moléculaire par homologie des autres RCPGs ; cette dernière méthode était la seule qui puisse révéler la structure 3D des autres récepteurs de la famille (Topiol et Sabio, 2009). La fiabilité de la méthode est liée au pourcentage d'homologie de séquences de la protéine modèle dont on connaît la



structure et de celle que l'on souhaite modéliser. On considère généralement qu'une structure peut être modélisée si le pourcentage d'homologie de similarité de séquences est supérieur à 80 % et que les parties manquantes dans la structure de base ne sont pas trop importantes. A savoir par exemple, une dizaine d'AAs qui représentent un feuillet  $\beta$  dans la protéine que l'on veut modéliser et qui ne sont pas présents dans la protéine modèle. Une solution est alors d'utiliser une autre protéine modèle dont la structure 3D corresponde pour cette partie à la protéine d'intérêt.

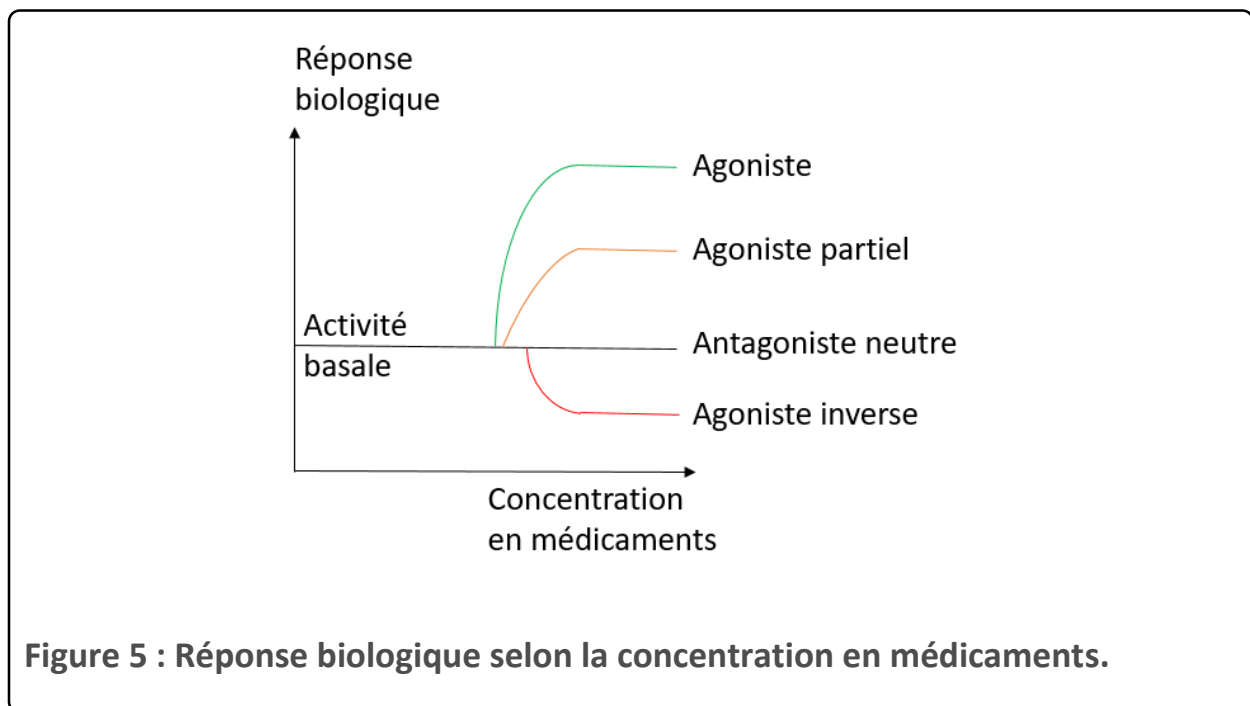
Bien que les RCPGs présentent tous une structure commune (**Figure 2**), la diversité des modes d'activation peut conduire à des différences structurales notables. Il est donc impossible de modéliser correctement tous les RCPGs à partir des rares structures existantes avant 2012. Toutes les études de *docking* ligand/récepteur avant 2012 ont été basées sur des récepteurs modélisés, notamment pour les récepteurs opioïdes. Depuis, le nouveau protocole de purification et de cristallisation mis au point par Kobilka en 2008 a permis de cristalliser les récepteurs opioïdes que nous allons décrire dans la partie suivante (Kobilka et Schertler, 2008).

## 2.2. Le récepteur opioïde $\mu$

Parmi les trois récepteurs opioïdes majoritaires, on retrouve les trois récepteurs  $\delta$ ,  $\kappa$  et  $\mu$  dans le cerveau,  $\kappa$  et  $\mu$  dans la moelle épinière et le récepteur  $\mu$  dans le système digestif (Mansour *et al.*, 1994). Le récepteur  $\mu$  ( $\mu$ OR pour  $\mu$  *opioid receptor*) est le plus représenté dans le corps et le principal activateur de

l'analgésie ; c'est la raison pour laquelle nous nous y sommes intéressés (Narita et al., 2001).

Le récepteur  $\mu$  est responsable d'un grand nombre d'autres effets tels que la détresse respiratoire, l'inhibition du transit gastro-intestinal, l'euphorie, l'anxiété et le relargage d'hormones (Law et al., 2013 ; Pasternak 2010). La **Figure 5** illustre la réponse biologique en fonction de la concentration en médicaments.

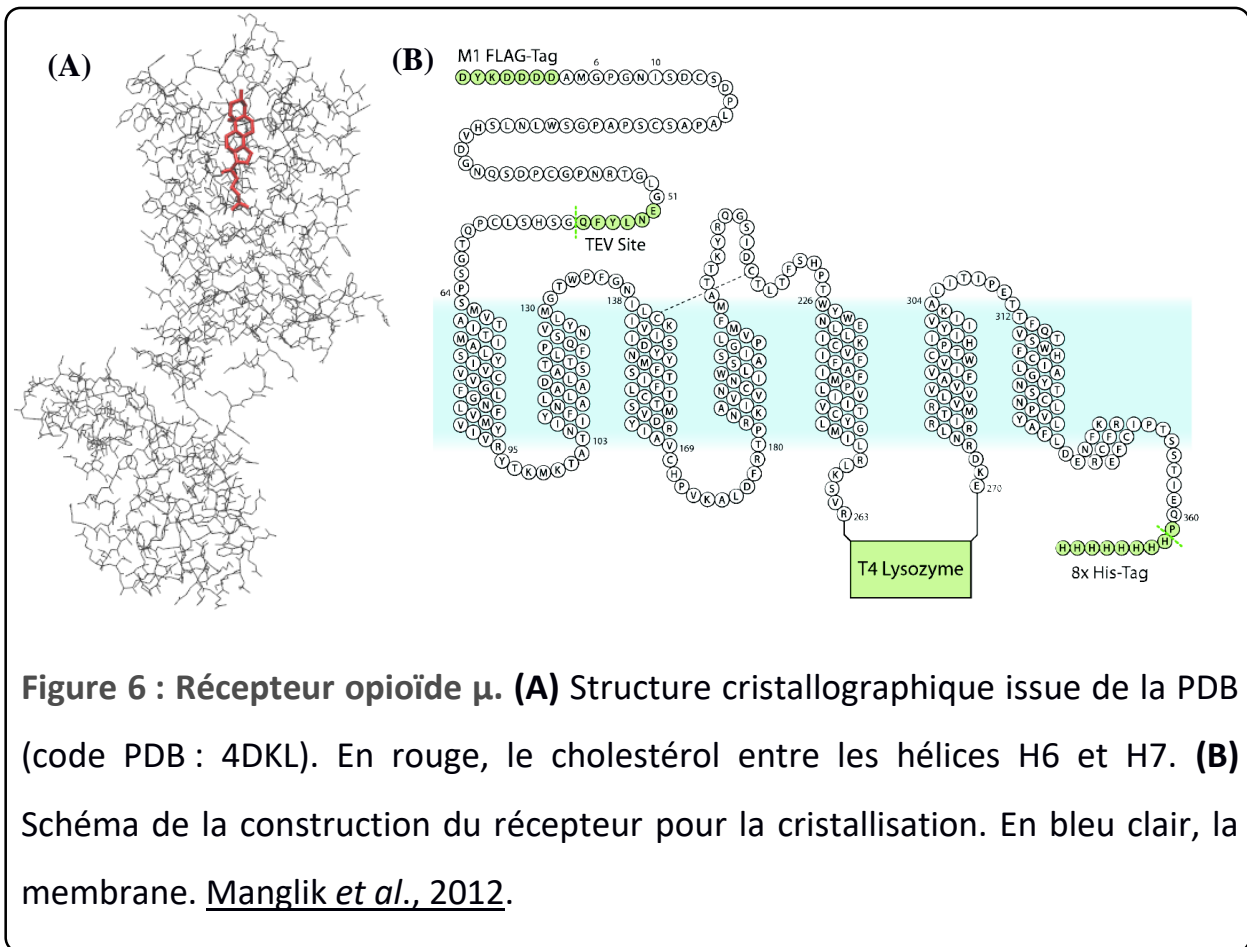


Les médicaments opiacés activent  $\mu$ OR, déclenchant ainsi la cascade de signalisation cellulaire par le couplage avec la protéine G. La **Figure 5** illustre le processus qui peut être activé de quatre manières différentes :

- Les peptides endogènes (agonistes) qui présentent un meilleur profil d'activation de  $\mu$ OR que les médicaments existants. Exemples :  $\beta$ -endorphine, endomorphines 1 et 2 ;

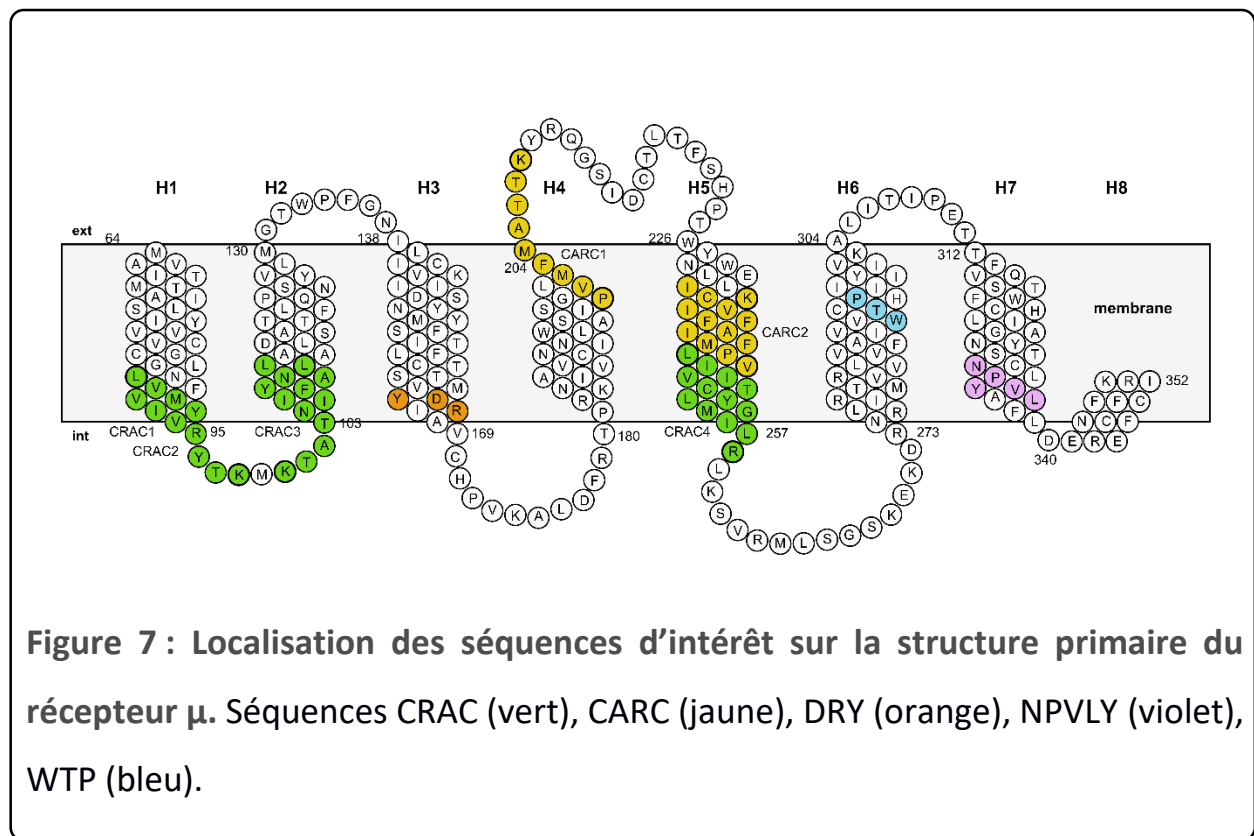
- Les agonistes partiels qui activent  $\mu$ OR tout en bloquant ou activant les signaux de transduction cellulaire (Siuda *et al.*, 2017). Exemple :  $\beta$ -funaltrexamine ;
- Les antagonistes neutres qui ne modifie pas l'activité basale mais qui inhibe l'effet des agonistes et agonistes inverses. Exemples : naloxone et naltrexone ;
- Les agonistes inverses qui interagissent avec le récepteur de la même manière que les agonistes en produisant l'effet inverse. Exemples : nalméfène,  $\beta$ -chlornaltrexamine et clocinnamox.

La structure 3D des trois récepteurs a été publiée en 2012 :  $\mu$  (Manglik *et al.*, 2012),  $\delta$  (Granier *et al.*, 2012) et  $\kappa$  (Wu *et al.*, 2012) dont les codes dans la Protein Data Bank (PDB) sont respectivement : 4DKL, 4EJ4 et 4DJH. La structure du récepteur opioïde murin, inactif, est cristallisé avec un antagoniste dans la poche du ligand pour stabiliser sa structure et un cholestérol situé entre les hélices H6 et H7 (**Figure 6**).



La structure du récepteur  $\mu$  inactif de la souris (*Mus musculus*) a été cristallisée avec une résolution de 2,8 Å avec un antagoniste irréversible, le  $\beta$ -funaltrexamine et un cholestérol (**Figure 6A**). Le site TEV est introduit dans la partie désordonnée C-terminale après la glycine 51. Pour faciliter la purification, une séquence d'affinité FLAG-Tag est rajoutée en N-terminale. De même, les résidus de la partie désordonnée C-terminal (361 à 398) ont été enlevés et ont été remplacés par une étiquette d'histidine pour purifier la protéine sur une colonne de chromatographie d'affinité. Les résidus de la boucle ICL3 (264 à 269) sont remplacés par le lysosyme T4 (**Figure 6B**).

La protéine forme dans le cristal un dimère  $\mu$ - $\mu$  dont l'interface est formée par les hélices H5 et H6. La poche pour le ligand orthostérique de la famille des endorphines est profonde et étirée. Cette poche est très flexible, ce qui permet d'accueillir une grande variété de ligands différents et de maintenir une activité basale (Cui *et al.*, 2013 ; Fossépré *et al.*, 2014 ; Cong *et al.*, 2015). Les sites allostériques sont localisés à l'interface protéine/lipides/eau. La **Figure 7** illustre les différents sites mentionnés dans la séquence primaire du récepteur  $\mu$ .



Il n'y a pas de ponts ioniques entre la séquence DRY de l'hélice H3 et la partie cytoplasmique de l'hélice H6 contrairement à ce que nous avons décrit dans la figure générale sur les RCPGs (**Figure 2**). Le motif NPxxY commun à tous les RCPGs

est présent dans l'hélice H7 avec la séquence suivante : NPVLY. La séquence WxP de l'hélice H6 est WTP pour  $\mu$ OR.

De plus, les séquences CRAC sont localisées dans les hélices H1, H2 et H5 et les séquences CARC dans les hélices H4 et H5. On respecte ainsi la distribution des deux séquences dans les couches interne et externe.

### 2.3. Complexes de récepteurs opioïdes

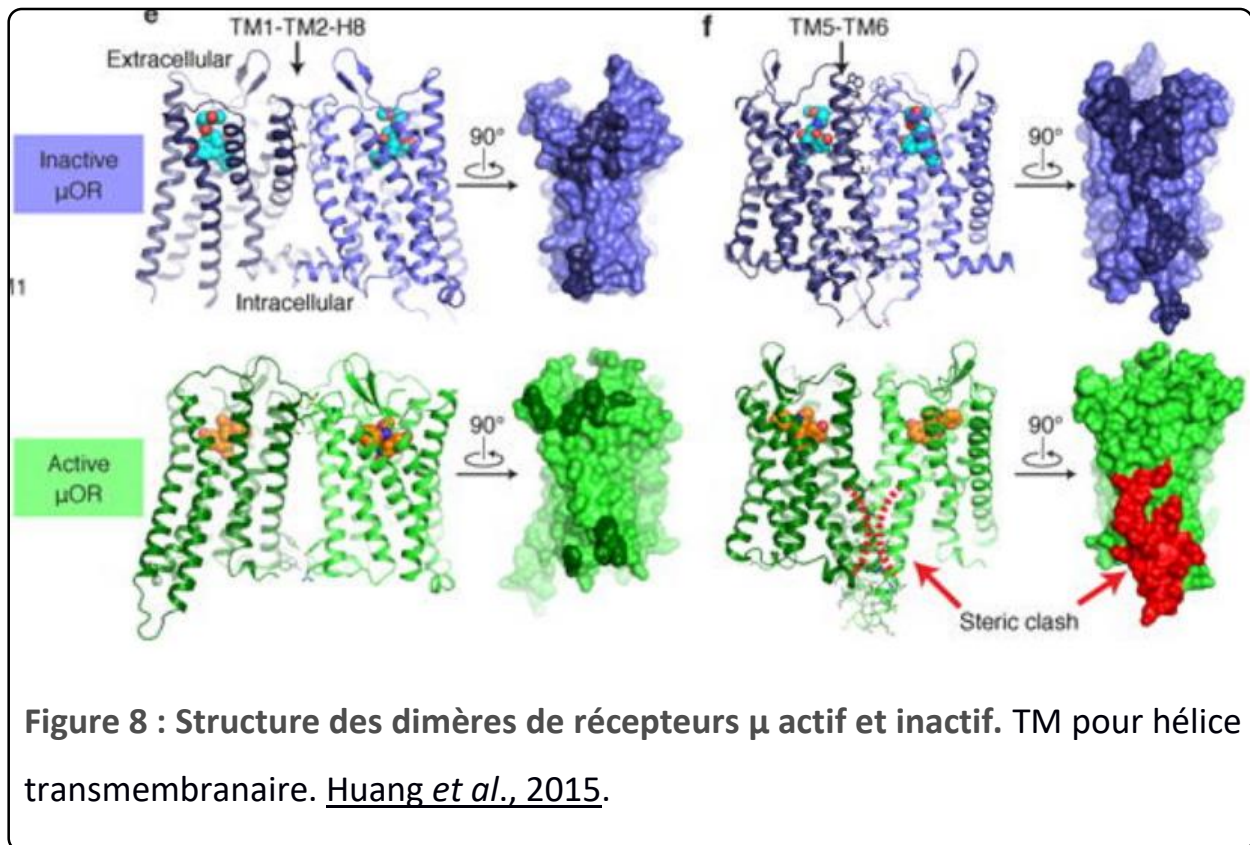
Il existe trois critères pour définir l'oligomérisation, à savoir :

- (1) Les éléments doivent être colocalisés et interagir physiquement ;
- (2) L'oligomère formé doit avoir des propriétés distinctes des monomères ;
- (3) La rupture de l'oligomère doit entraîner l'arrêt de ses propriétés.

Ces critères ont été validés par un grand ensemble d'expérimentations détaillées dans Gomes *et al.*, 2016. Les récepteurs opioïdes sont tous localisés dans la membrane plasmique et peuvent interagir ensemble, ce qui satisfait au premier critère. L'oligomère formé de  $\mu$  et  $\delta$  par exemple, a des propriétés distinctes des monomères seuls : l'association des deux récepteurs augmente l'effet analgésique du récepteur  $\mu$  tout en diminuant les effets secondaires grâce au récepteur  $\delta$ . Enfin, une fois le dimère activé par le ligand, il y a couplage aux protéines G et déclenchement de la cascade de signalisation cellulaire, puis internalisation du récepteur pour recyclage ou destruction. Bien que le mécanisme d'activation des RCPGs ne soit pas complètement élucidé, un grand nombre de preuves expérimentales et théoriques prouvent l'existence des oligomères et leur potentiel thérapeutique (Periole *et al.*, 2012 ; Meng *et al.*, 2014 ; Gaitonde et González-Maeso, 2017).

Comme nous l'avons constaté, la structure du récepteur  $\mu$ OR inactif est un dimère  $\mu/\mu$  formé par l'interface H5/H6. Une autre interface parallèle existe, H1/H2/H8 avec des contacts moins fréquents que pour la première interface (Manglik *et al.*, 2012). Le récepteur  $\mu$ OR actif a été cristallisé en 2015 (code PDB : 5C1M) et les interfaces de dimérisation ont aussi été intensivement étudiées (Huang *et al.*, 2015).

De manière générale, les interfaces de dimérisation des RCPGs font l'objet de spéculations et d'études computationnelles depuis 15 ans (Meng *et al.*, 2014 ; Farran, 2017). Il faudra attendre la résolution des structures cristallographiques des récepteurs opioïdes pour en avoir des preuves expérimentales (Manglik *et al.*, 2012 ; Huang *et al.*, 2015). La **Figure 8** illustre la comparaison entre les deux interfaces majoritaires pour les conformations active (5C1M) et inactive (4DKL) du récepteur.



Ainsi qu'on peut le voir à la **Figure 8**, l'interface la moins fréquente H1/H2/H8 est spatialement possible pour former un dimère indépendamment de l'activité de  $\mu$ OR. L'autre interface, H5/H6, permet de former un dimère lorsque le récepteur  $\mu$  est en conformation inactive seulement. De nombreuses hypothèses ont déjà été émises sur les liens entre la structure (active et inactive) et la dimérisation, le domaine a été étudié de manière approfondie en tenant compte des différentes combinaisons entre les différents récepteurs opioïdes (Shang et Filizola, 2015). Les dimères les plus étudiés sont  $\mu/\mu$  (Marino *et al.*, 2016),  $\mu/\delta$  (Erbs *et al.*, 2014 ; Gaitonde et González-Maeso, 2017) et  $\delta/\delta$  (Stockton et Devi, 2012). Il est intéressant de constater que l'interface H1/H2/H8 est commune pour les dimères  $\mu/\mu$  et  $\delta/\delta$  (Johnston et Filizola, 2014). Les ligands bitopiques qui activent le



dimère  $\mu/\delta$  diminuent les effets de dépendance et de tolérance qui sont présents pour  $\mu$  (Stockton et Devi, 2012). L'activation du récepteur  $\mu$  entraîne un effet analgésique fort et celle du récepteur  $\delta$ , une diminution des effets secondaires. L'analgésie n'est cependant pas complète (Ananthan, 2006).

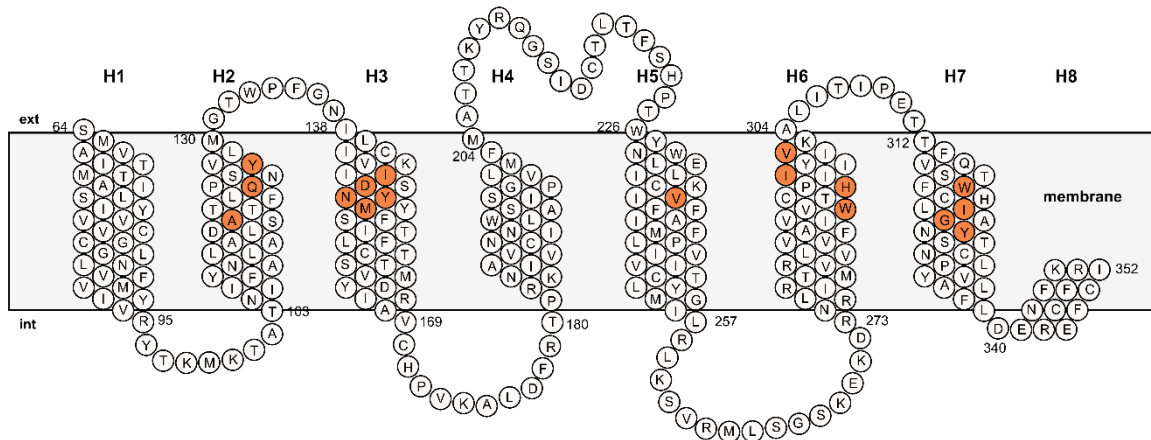
En 2015, d'autres travaux ont analysé les propriétés cinétiques des lipides interagissant avec les récepteurs opioïdes et exploré leur rôle potentiel dans la modulation de l'oligomérisation et du ratio entre les différents récepteurs (Provasi et al., 2015).

De nombreuses hypothèses ont aussi été formulées quant au mécanisme d'activation qui n'est toujours pas élucidé à ce jour. Ainsi, le ligand peut activer le récepteur qui forme ensuite un complexe avec la protéine G (**Figures 1 et 5**). Dans le cas des récepteurs opioïdes, on ne sait pas encore si le récepteur est un monomère, un dimère (seul ou en complexe), voire un tétramère (seul ou avec les autres récepteurs) avant et/ou après l'activation par le ligand (Ferré et al., 2014).

Il est connu que le récepteur existe sous plusieurs formes au cours de son cycle de vie : monomère ou différentes formes d'oligomères (Guo et al., 2017). On ne sait pas ce qui guide la formation des complexes et leur rôle sur la conformation active ou inactive du récepteur. De plus, il a été montré que le complexe se déplaçait dans la membrane avant ou après l'interaction avec la protéine G avant de déclencher la cascade de signalisation cellulaire (Ferré et al., 2014).

Pour formuler une hypothèse de base sur le mécanisme d'activation du récepteur  $\mu$ , nous nous sommes basés sur les évidences expérimentales existantes pour d'autres RCPGs de la même classe que les récepteurs opioïdes. En effet, ces récepteurs sont proches en termes de séquence et de structure (c'est la base de la définition de la famille des RCPGs). Il est donc permis d'extrapoler quant au mécanisme de  $\mu$ OR à partir des comportements observés pour les récepteurs à la cholécystokinine (Desai et Miller, 2012), ou au thromboxane (Ibrahim *et al.*, 2013) et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Prasanna *et al.*, 2014), mais aussi plus récemment à partir de l'étude réalisée sur la forme active du récepteur  $\mu$ OR, comparée aux récepteurs  $\beta_2$  adrénergique (Huang *et al.*, 2015).

Trois AAs de la poche active des trois récepteurs sont communs, à savoir D147 et I155 de l'hélice H3 et W293 dans H6. Leur réarrangement spatial module la forme de la poche et donc l'activation des récepteurs. D147 dans l'hélice H3 est aussi étudié intensivement pour son rôle dans l'activation du récepteur, induit par le changement de conformation de la chaîne latérale qui augmente l'affinité des agonistes pour la poche du ligand (Shim *et al.*, 2013). Une figure adaptée de cette publication résume les interactions avec les différents ligands (**Figure 9**).



**Figure 9 : Schéma des régions de liaison des ligands au récepteur  $\mu$ OR. En orange, les acides aminés impliqués dans l'activation du récepteur  $\mu$ OR. Adapté de Shim *et al.*, 2013.**

Une hypothèse importante de départ de notre travail de thèse est donc la suivante : les protéines forment un dimère sous l'influence de l'environnement lipidique qui favorise les contacts entre les récepteurs et induisent ensuite leur déplacement dans la membrane de la partie fluide vers les parties rigides, les radeaux lipidiques.

Les interactions protéine-lipides ont un rôle dans le phénomène de dimérisation des protéines (Gahbauer et Böckmann, 2016 ; Marino *et al.*, 2016). En effet, elles promeuvent certainement l'oligomérisation des RCPGs et impacte donc leurs fonctions. Par exemple, l'interaction du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique avec du cholestérol induit la dimérisation du récepteur (Fantini et Barrantes, 2013).

Pour mieux comprendre l'importance de l'environnement lipidique, nous aborderons dans les parties suivantes une description de la structure 3D et de la

composition de la membrane et nous résumerons les études préalables, autant expérimentales que théoriques, sur les interactions protéine-membrane.

### 3. La membrane

#### 3.1. Fonctions

Les membranes sont indispensables à la vie : elles jouent le rôle de frontières sélectives entre l'environnement extérieur et intérieur d'une cellule (van Meer et al., 2008). De cette manière, la composition du milieu intracellulaire est différente du milieu extracellulaire. On distingue les membranes internes qui organisent la cellule en organites subcellulaires tels que le noyau, le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi et la membrane plasmique qui isole la cellule, lui donne son unité et sa structure.

La membrane participe aux échanges avec l'extérieur par la reconnaissance intercellulaire (antigènes de surface), les mouvements (pseudopodes, endocytose et exocytose) et les échanges d'informations entre cellules par le biais des récepteurs hormonaux et des jonctions *gap*.

Le rôle de frontière sélective est rempli avec la régulation des échanges de molécules. Ce transport est passif dans le cas de la diffusion de petites molécules comme les ions, les gaz, les peptides hydrophobes. Pour les molécules de plus haut poids moléculaire, le transfert est soit actif par l'intermédiaire de canaux protéiques, soit par diffusion facilitée à travers la bicouche lipidique.

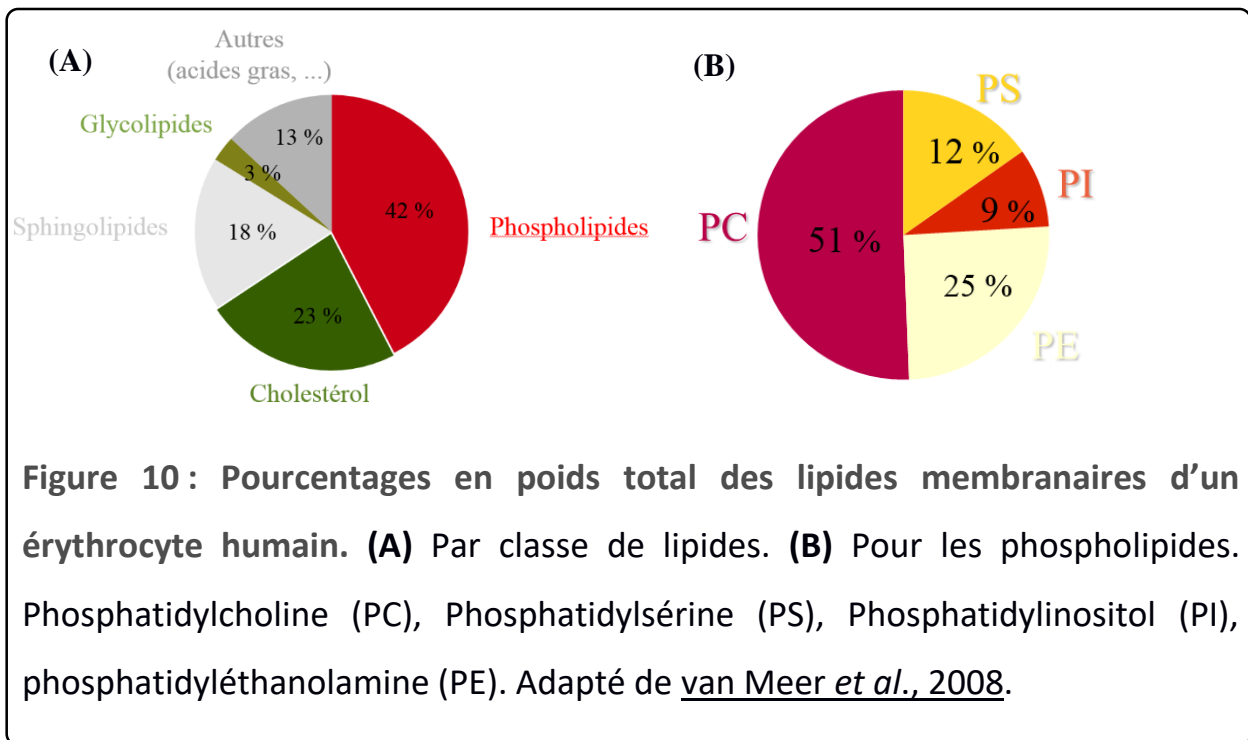
Enfin, la membrane est un milieu hydrophobe qui procure un site pour les réactions chimiques qui ne peuvent pas se produire en milieu aqueux. Elle régule

le métabolisme par la transduction intracellulaire de signaux extracellulaires. Citons le cas du mécanisme d'activation des RCPGs, expliqué auparavant (Bagatolli et Mouritsen, 2013).

### 3.2. Composition

Pour remplir ces fonctions, la membrane est constituée d'une bicouche lipidique et de protéines membranaires. Parmi ces dernières, on retrouve deux types : les protéines intrinsèques ou transmembranaires qui sont insérées dans la membrane et les protéines extrinsèques ou périphériques qui sont accolées à la membrane par des interactions électrostatiques ou des ancrages, *via* des chaînes carbonées (palmitoylation d'une cystéine par exemple pour  $\mu$ OR) ou des séquences d'AAs hydrophobes (Laganowsky *et al.*, 2014 ; Muro *et al.*, 2014 ; Pogozheva *et al.*, 2014). Les protéines constituent 50 % de la masse ; cette concentration importante limite leurs mouvements dans la membrane.

Il existe des milliers de lipides différents dans nos cellules, codés par environ 5 % des enzymes du génome humain (Sud *et al.*, 2007 ; van Meer et de Kroon, 2011). L'étude des lipides est en pleine expansion, on parle maintenant de lipidomique (Fahy *et al.*, 2011 ; Merrill *et al.*, 2013). On y trouve des glycérophospholipides, des sphingomyélines et du cholestérol. Parmi les glycérophospholipides on trouve majoritairement des phosphatidylcholines (PC), des phosphatidyléthanolamines (PE), des phosphatidylsérines (PS), des phosphatidylinositols (PI) et des acides phosphatidiques. La **Figure 10** illustre les proportions pour chaque lipide de la membrane.

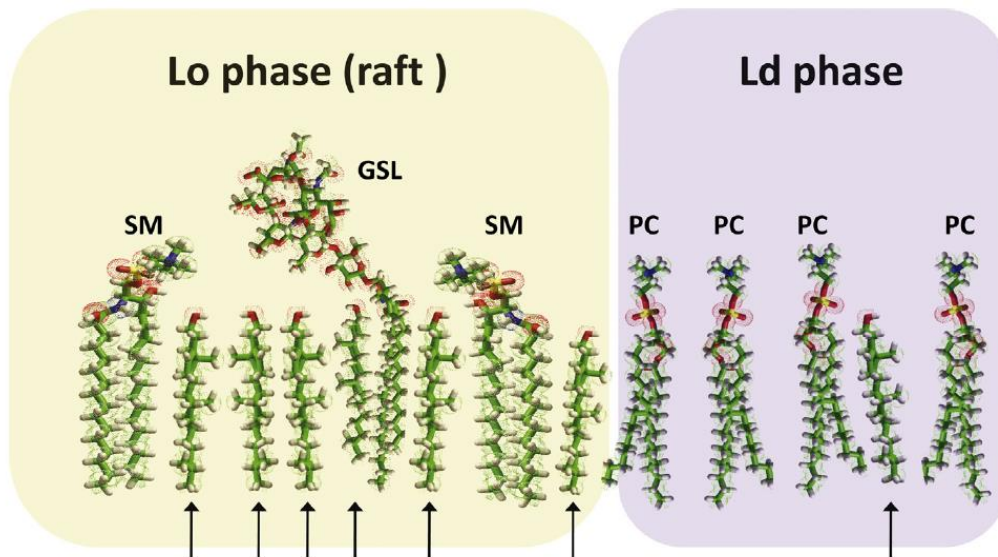


Les phospholipides sont les plus représentés et parmi ceux-ci, les PCs comptent pour plus de la moitié. Ils ont une forme cylindrique et ils sont majoritairement répartis dans la couche externe de la membrane. Au contraire, les PEs sont préférentiellement retrouvés dans la couche interne de la membrane et ils ont une forme conique à cause de la taille réduite de la tête éthanolamine. La distribution des lipides étant asymétrique et les lipides ayant des géométries 3D variables, la courbure de la membrane est ainsi formée. PC et PE sont chargés respectivement positivement avec la choline et l'éthanolamine, PS, négativement avec la sérine et PI, neutre avec l'inositol.

Le cholestérol est le second lipide le plus représenté dans les membranes eucaryotes. Sa structure est composée de quatre cycles avec une fonction alcool et une chaîne carbonée. Le cholestérol peut se placer parallèlement aux autres lipides ou perpendiculairement entre les deux couches de lipides de la

membrane. Il a un rôle de tampon thermique ; au-delà de 37°C, il limite les mouvements des phospholipides et la fluidité de la membrane diminue. En-dessous de 37°C, il empêche l'entassement des phospholipides et la cristallisation des acides gras ; la fluidité augmente.

Les sphingolipides sont constitués d'une sphingosine et d'un acide gras. Selon la nature de l'acide gras, on distingue les céramides (avec un atome d'hydrogène), la sphingomyéline (avec la phosphocholine) et les glycosphingolipides (avec un sucre). La plus représentée est la sphingomyéline. La chaîne est saturée ou trans-insaturée, de la même longueur que les PCs ; elles forment des cylindres plus longs et une structure plus compacte. La **Figure 11** illustre les différentes phases de la membrane et leur composition lipidique.



**Figure 11 :** Schéma des phases de la membrane et répartition du cholestérol. Dans la phase  $L_{\beta}$  ou  $L_o$ , le cholestérol est masqué par les sphingomyélines (SM) et les glycosphingolipides (GSL). Dans la phase  $L_{\alpha}$  ou  $L_d$ , le cholestérol est entouré de glycérophospholipides, tels que les phosphatidylcholines (PC). Les flèches indiquent le cholestérol. Fantini *et al.*, 2016.

La diffusion latérale des protéines est freinée par les différentes phases lipidiques (Fantini *et al.*, 2016). Il existe deux phases lipidiques : la phase gel  $L_{\beta}$  et la phase fluide  $L_{\alpha}$ , aussi appelées respectivement  $L_o$  et  $L_d$  dans la littérature en anglais, tel qu'à la **Figure 11** (Nagle et Tristram-Nagle, 2000). Elles sont caractérisées par un arrangement spatial différent et une liberté de mouvement propre à chaque lipide (van Meer *et al.*, 2008). Les deux phases lipidiques sont caractérisées par une composition lipidique différente. On retrouve majoritairement dans la phase fluide des phospholipides insaturés et une faible proportion de cholestérol,



inférieure à 10 % (de Meyer et Smit, 2009). Le cholestérol, en s'intercalant entre les lipides, empêche la cristallisation de la bicouche. La phase gel est composée de phospholipides saturés, d'une plus grande proportion de cholestérol (30 % au maximum) et d'une plus grande proportion de sphingomyéline.

Au-delà de la concentration en cholestérol, la température a également un rôle sur le passage d'un état ordonné à désordonné (et réciproquement) de la membrane ; on parle de température de transition de phase ( $T_m$ ). L'augmentation de la température induit plus de mouvements de rotation autour des liaisons C-C et la fluidité de la membrane augmente. Il faut plus d'énergie pour initier ces rotations si la chaîne alkyle est longue. Donc la température de transition augmente.

De la même manière, plus il y a d'insaturations en conformation *trans* sur la chaîne alkyle et plus la fluidité de la membrane augmente (Benett et al., 2018). Lorsque les chaînes alkyles présentent plus de rotamères droits, les lipides adoptent la conformation de plus faible énergie qui mène à une organisation de la membrane très ordonnée et donc très rigide. La  $T_m$  étant propre à chaque espèce lipidique, c'est le mélange des lipides et les interactions entre eux qui détermine la  $T_m$  de la membrane.

Nous verrons par la suite comment les proportions en lipides modifient les propriétés de la membrane.

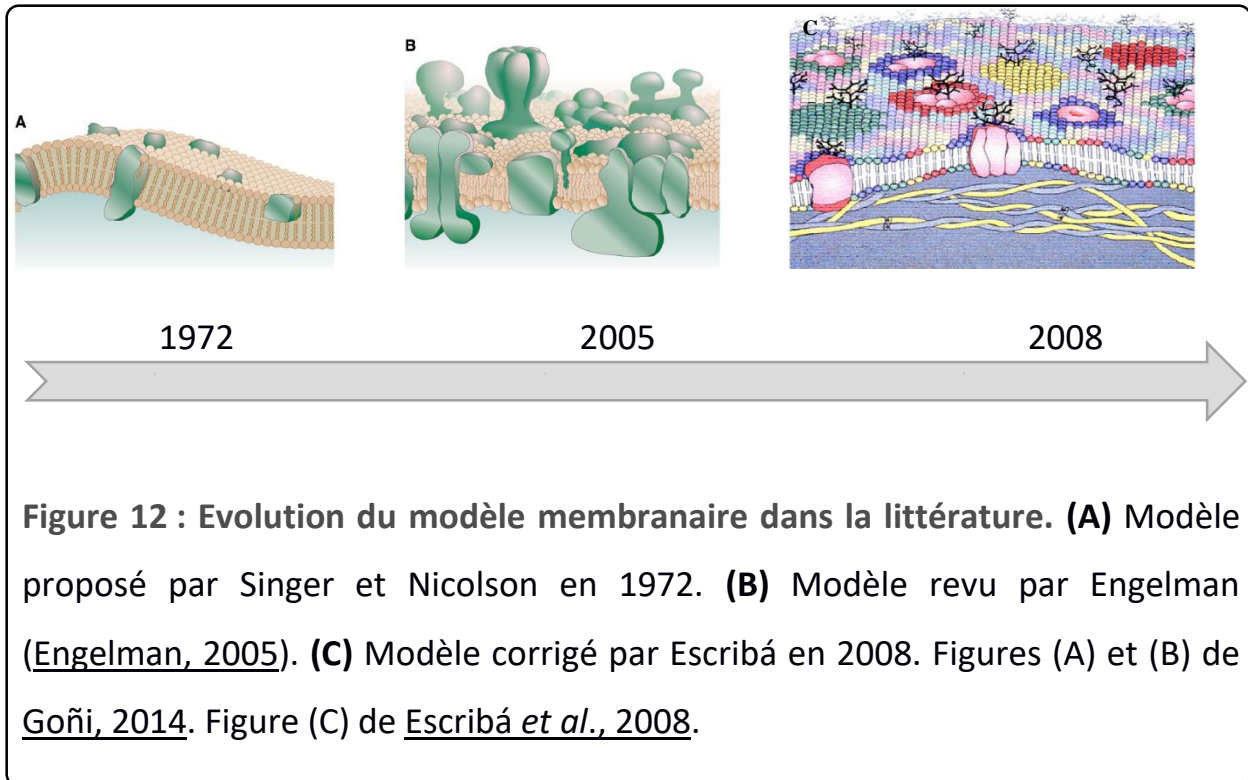
### 3.3. Structure

L'évolution des modèles membranaires est illustrée à la **Figure 12**. La structure 3D de la membrane est intensivement étudiée depuis 1972 où Singer et Nicolson proposèrent un premier modèle de mosaïque fluide (Singer et Nicolson, 1972) constituée d'une bicouche lipidique et de quelques protéines (**Figure 12A**). Les lipides et les protéines, transmembranaires et périphériques, pouvaient circuler librement d'où le nom de mosaïque fluide pour ce système asymétrique.

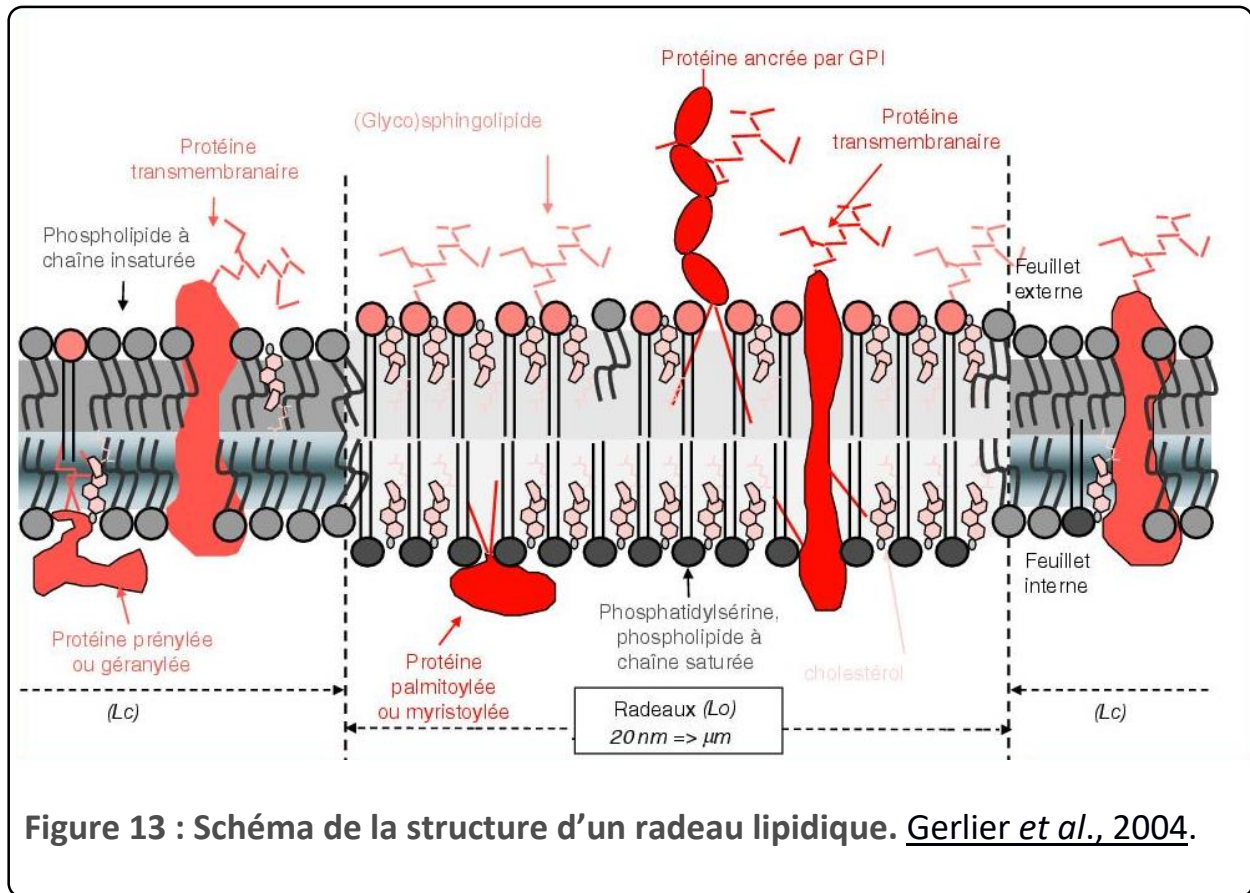
Par la suite, Engelman en 2005 proposa une correction des propriétés du modèle (**Figure 12B**). Parmi les nombreuses corrections proposées, retenons celles qui modifient notre perception : la membrane est composée à 50 % de protéines et son épaisseur est variable (Goñi, 2014). L'augmentation de la concentration de protéines dans la membrane induit une plus grande influence de leur part sur la structure et les fonctions de la membrane, ainsi qu'un nombre important de contacts entre elles.

Les protéines transmembranaires présentent un cœur hydrophobe qui n'est pas toujours en adéquation avec l'épaisseur de la membrane (30 Å). On parle de mésappariement hydrophobique si les hélices  $\alpha$  sont plus courtes ou plus longues que l'épaisseur de la membrane. Pour limiter l'entropie du système, les hélices peuvent s'incliner (angle *tilt*), ce qui diminue l'exposition des AAs apolaires à l'extérieur de la membrane dans le cas où la protéine est plus allongée. En retour, les lipides peuvent s'allonger ou s'écraser dans la membrane. Nous verrons par la suite par quel mécanisme. A la **Figure 12C**, le modèle proposé par Escribá *et al.* montre la grande variété de lipides dans les radeaux lipidiques autour des

protéines transmembranaires et leur distribution asymétrique à travers la membrane (Nicolson, 2013).



On est toujours dans un modèle de mosaïque fluide avec des échanges libres de lipides dans des ilots, appelés radeaux lipidiques. Leur existence est très controversée depuis des années à cause du manque de preuves expérimentales (Bagatolli *et al.*, 2010 ; Bagatolli et Mouritsen, 2013). Les avancées techniques permettent maintenant de caractériser ces ilots concernant leur structure, leur rôle et leur composition lipidique (**Figure 13**).



C'est la grande concentration en cholestérol (environ 30 %), en sphingomyéline et en phospholipides saturés qui a permis dans un premier temps d'avancer l'argument de structures compactes (Hakobayan et Heuer, 2014). On voit ainsi l'apparition d'une nouvelle phase  $L_o$ , aux propriétés intermédiaires entre la phase fluide et la phase gel (Figure 13). La rigidification de la membrane limite les mouvements des protéines, ce qui promeut les contacts entre protéines. Au niveau structural, ces domaines ont des tailles très variables de 10 à 200 nm. Leurs rôles sont :

- Un site de déclenchement des cascades d'activation,
- Une plateforme d'intégration des cascades d'activation,

- Un rassemblement des protéines d'une voie d'activation.

Dans le cas du récepteur  $\mu$ OR, l'hypothèse avancée est la suivante : le récepteur activé se déplace dans la membrane vers un radeau lipidique pour interagir avec son partenaire, la protéine G. Plusieurs questions annexes sont dès lors formulées autour de cette hypothèse. Le récepteur est-il activé avant ou après son arrivée dans le radeau lipidique ? Sous quelle forme : monomère, dimère, tétramère ? La protéine G est-elle présente dans un radeau lipidique avant l'arrivée du récepteur opioïde ou vient-elle après ?

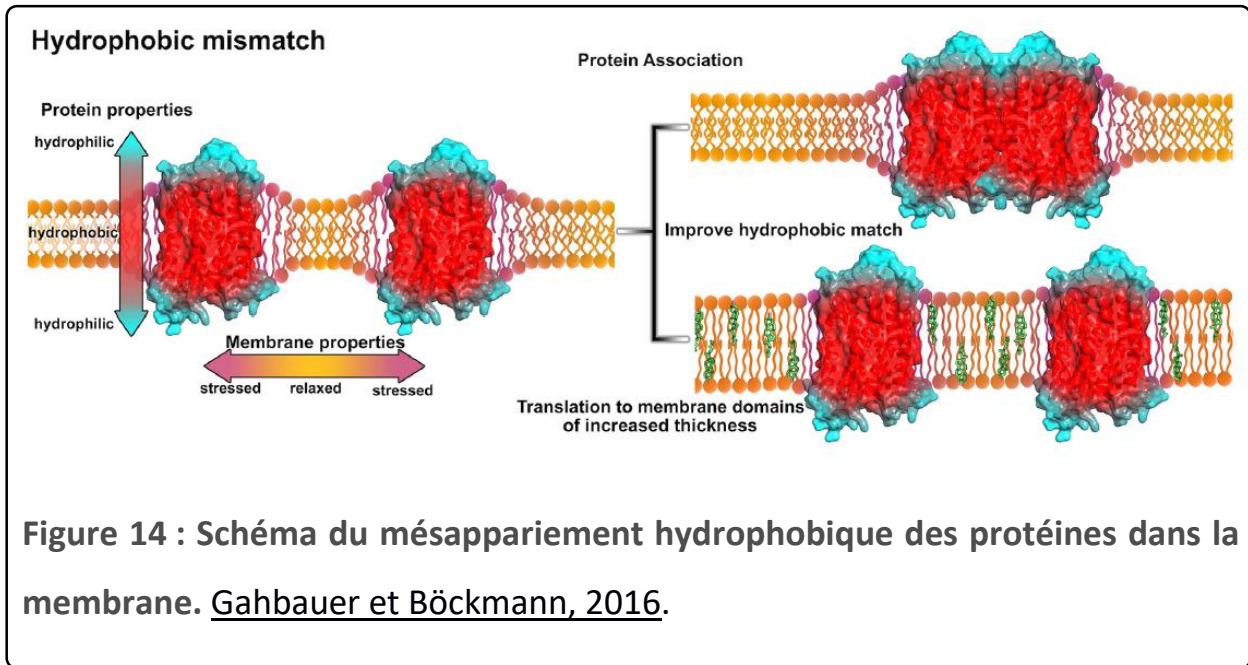
## 4. Interactions protéines-membrane

### 4.1. Généralités

Les protéines membranaires sont soumises aux fluctuations du milieu dans lequel elles se trouvent. Ainsi, la membrane joue un grand rôle dans les modifications structurales des protéines et par conséquent dans les fonctions de celles-ci (Lee, 2003 ; Palsdottir et Hunte, 2004 ; Lee, 2011 ; Laganowsky et al., 2014). Les interactions protéine-membrane ont déjà été étudiées intensivement tant expérimentalement que théoriquement (Chavent et al., 2016).

On a longtemps pensé que les lipides de la membrane avaient un effet limité sur la membrane en changeant ses propriétés structurales, telles que l'épaisseur, la courbure, la tension de surface et les propriétés élastiques. Ces interactions non spécifiques sont certes importantes ; les plus intéressantes sont spécifiques entre les AAs de la protéine et les lipides (Benett et Tieleman, 2013 ; Katira et al., 2016)

Tout d'abord le cœur hydrophobe de la protéine en contact avec la membrane est rarement de la même longueur que l'épaisseur de la membrane ; comme déjà mentionné, on parle de mésappariement hydrophobe (**Figure 14**).



Pour limiter l'entropie du système en exposant les parties hydrophiles dans les milieux aqueux, plusieurs solutions existent :

- Les hélices de la protéine s'inclinent pour augmenter ou diminuer les parties exposées à la membrane ;
- La dimérisation ou l'oligomérisation des protéines permet d'éviter les contacts des parties polaires avec le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique (**Figure 14**) ;
- La protéine se déplace vers une partie de la membrane plus épaisse, *i.e.*, plus riche en cholestérol (**Figure 14**) ;
- L'épaisseur de la membrane augmente conjointement avec la proportion de rotamères gauches pour les lipides environnant la protéine.

En pratique, tous les phénomènes entrent en jeu. Le mésappariement hydrophobique est compensé dans un premier temps par les modifications structurales des lipides qui sont plus rapides que les autres actions décrites et qui interviennent dans un second temps.

En particulier, le mésappariement hydrophobique est un vecteur de la formation des oligomères de RCPGs (Gahbauer et Böckmann, 2016). C'est illustré par le déplacement des RCPGs dans les radeaux lipidiques, tel que pour le récepteur à la sérotonine 1A qui est modulée par le cholestérol (Pucadyil et Chattopahyay, 2006).

Voyons maintenant plus précisément les implications concernant les interactions entre les RCPGs et les lipides.

#### 4.2. Les RCPGs et les lipides

De nombreux récepteurs ont été cristallisés avec un ou plusieurs lipides, comme le récepteur de la sérotonine 5-HT2B-BRIL (Wacker et al., 2013), comme :

- L'acide oléique : le récepteur chémokine CXCR4 (Wu et al., 2010), le récepteur nociceptine/orphanine FQ (Thompson et al., 2012), le facteur de relaxation corticotropine 1 (Hollenstein et al., 2013), le récepteur sérotonine 5-HT2B-BRIL (Wacker et al., 2013), le récepteur au goût (Wang et al., 2013), le récepteur glutamate métabotropique (Wu et al., 2014) et le récepteur glutamate métabotropique 5 (Doré et al., 2014) ;
- L'acide stéarique : le récepteur A2A adénosine (Jaakola et al., 2008) et le récepteur OX2 orexine (Yin et al., 2015) ;



- Le cholestérol : le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique (Cherezov et al., 2008), le récepteur de la sérotonine 5-HT<sub>2B</sub>-BRIL (Wacker et al., 2013), le récepteur glutamate métabotropique (Wu et al., 2014), le purinocyté P<sub>2Y</sub> 12 (Zhang et al., 2014) et le récepteur opioïde  $\mu$  (Manglik et al., 2012).

De nombreuses expériences biochimiques montrent le rôle du cholestérol dans la fonction des RCPGs (Paila et Chattopadhyay, 2009 ; Chattopadhyay, 2014 ; Huster et al., 2014). Plus précisément, mentionnons la rhodopsine (Benett et al., 2009) et les récepteurs à : la cholécystokinine (Harikumar et al., 2005 ; Desai et Miller, 2012), la sérotonine 1A (Prasanna et al., 2016 ; Pucadyil et al., 2006) et la sérotonine 7 (Sjögren et Svenningsson, 2007) et la galanine GAL2 (Pang et al., 1999).

De nombreuses études ont également été réalisées par des approches théoriques pour compléter ces résultats expérimentaux. A ce jour, peu de méthodes expérimentales permettent d'investiguer précisément et complètement les interactions entre un lipide et les AAs d'une protéine à l'échelle atomique. Il est donc nécessaire de modéliser ces interactions de manière théorique. Pour cela, la dynamique moléculaire classique (DM) s'est avérée une méthode de choix pour étudier les interactions protéine-lipides, dans le cas de la rhodopsine par exemple (Chavent et al., 2016 ; Miao et McCammon, 2016 ; Madariaga-Mazón et al., 2017). Dans le **Tableau 1**, nous mentionnons les systèmes étudiés par DM avant 2012.



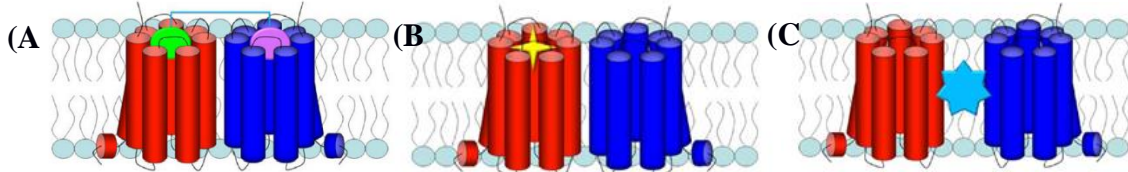
GPCR	Composition de la membrane (proportions des lipides)	Temps de simulations	Références
Rhodopsine	SDPC	12.4 ns	<u>Feller et al., 2003</u>
Rhodopsine	DOPC	40 ns	<u>Crozier et al., 2003</u>
Gonadotropine	DPPC	245 ns	<u>Pitman et al., 2005</u>
Rhodopsine	SDPC:SDPE:CHO (2:2:1)	2.6 $\mu$ s	<u>Grossfield et al., 2006</u>
Rhodopsine	DMPC/PLPC/DPPC/POPC	80 ns	<u>Cordomí et al., 2007</u>
Rhodopsine	SDPC:SDPE:CHO (2:2:1)	118 ns	<u>Jardón-Valadez et al., 2008</u>
Cannabinoïd	POPC	105 ns	<u>Shim, 2009</u>
Rhodopsine	SDPC:SDPE:CHO (2:2:1)	1.6 $\mu$ s	<u>Kelashvili et al., 2009</u>
Adénosine	POPC	$\approx$ 3 $\mu$ s	<u>Lyman et al., 2009</u>
Sérotonine	DiC(14 à 20:1)PC	> 2 $\mu$ s	<u>Mondal et al., 2013</u> <u>Shan et al., 2012</u>
Rhodopsine	SDPC:SDPE:CHO (2:2:1)	4.3 $\mu$ s	<u>Olausson et al., 2012</u>

**Tableau 1 : Liste chronologique des simulations par DM des RCPGs au sein d'une membrane.** Chol (Cholestérol). DiCPC (1,2-distéaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine à 1,2-diicosaenoyl phosphatidylcholine). DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). DSPC (1,2-distéaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine). PLPC (palmitoyl linoléyl phosphatidylcholine). POPC (1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). SDPC (1-stéaroyl-2-

docosahexaenoyl phosphatidylcholine). SDPE (1-stéaroyl-2-docosahexaenoyl phosphatidyléthanolamine). Adapté de Sadiq *et al.*, 2013.

Dans le **Tableau 1**, nous notons qu'avant la résolution des structures des récepteurs opioïdes en 2012, seulement sept structures cristallographiques de RCPGs étaient disponibles (**Figure 4**). De plus les moyens de calcul n'étant pas aussi performants qu'actuellement, les temps de simulation étaient relativement réduits : de 12.3 ns en 2003 à 4.3  $\mu$ s en 2012. La rhodopsine a été intensivement étudiée avec sept études entre 2003 et 2012, contre une seule étude pour les récepteurs gonadotropine en 2005, canabinoïde en 2009 et adénosine en 2009 et deux pour le récepteur sérotonine en 2011 et 2012.

Nous avons déjà abordé la question de la dimérisation induite par les lipides dans la partie sur les complexes de récepteurs avec le cholestérol notamment. Depuis, un nombre croissant d'études expérimentales et théoriques d'oligomérisation des RCPGs est disponible dans la littérature, ce qui atteste de l'intérêt à comprendre le mécanisme d'activation des récepteurs (Filizola, 2011, Pluhackova *et al.*, 2016). Le but de ces nombreux travaux est de guider plus efficacement la conception de nouveaux médicaments en ciblant mieux la/les poche(s) des ligands potentiels, orthostérique et allostérique par des ligands, tel qu'illustré à la **Figure 15**.



**Figure 15 : Schéma de la conception des ligands d'oligomères. (A) Ligands bitopiques. (B) Ligand monosite. (C) Perturbateurs d'interface oligomérique. Filizola, 2011.**

Les ligands bivalents ou bitopiques sont composés de deux molécules, réunies par un groupement espaceur, le plus souvent de type acyl, qui se positionnent dans le site orthostérique de chacun des récepteurs (**Figure 15A**). Le plus difficile dans la conception de ces ligands est le choix du groupement entre les deux pharmacophores qui doit permettre une interaction optimale. La nature fortement apolaire de l'espaceur conduit à une diminution de la perméabilité du composé dans la barrière hémato-encéphalique. Ces ligands ont été particulièrement étudiés pour le dimère opioïde  $\mu/\delta$  (Giri et Hruby, 2014 ; Deekonda *et al.*, 2015 ; Vardanyan *et al.*, 2017).

Pour améliorer les médicaments qui ciblent les oligomères, on peut aussi élaborer un médicament monosite qui cible spécifiquement l'oligomère formé (**Figure 15B**). Dans la partie sur l'oligomérisation, nous avons déjà indiqué les trois conditions pour caractériser l'existence d'un oligomère, telle que la modification du site actif des récepteurs monomériques. Un des premiers ligands proposés ciblait le dimère  $\delta/\kappa$  (Waldhoer *et al.*, 2004).

Enfin, la dernière stratégie consiste à empêcher l'oligomérisation en plaçant un perturbateur à l'interface lorsque celle-ci conduit à des maladies (**Figure 15C**).

L'interface représente une aire beaucoup plus importante que dans le cas des interactions protéine-protéine, avec de nombreuses poches à la surface de la protéine, donc non plane. Cette interface étant située dans la membrane, il faut passer la barrière polaire formée par les têtes des lipides avant l'insertion ciblée sur la protéine d'intérêt. De plus, seuls certains AAs sont importants dans ces interfaces et il est difficile de les déterminer. Une fois identifiés, il faut encore concevoir les ligands qui les cibleront, souvent des petits peptides qui interagiront spécifiquement avec l'hélice concernée.

Depuis 2013, l'induction de la dimérisation est expliquée par des effets à long terme dus au mésappariement hydrophobique, par une énergie du système non favorable mais aussi par les interactions des récepteurs avec les lipides environnants, tel que le cholestérol (Fantini et Barrantes, 2013 ; Pluhackova *et al.*, 2016).

Il a été montré qu'une augmentation de la concentration en cholestérol augmentait la plasticité conformationnelle et la flexibilité rotationnelle du récepteur sérotonine 1A, de la classe A des RCPGs (Prasanna *et al.*, 2016). Les deux interfaces principales pour les dimères sont régulées par la concentration en cholestérol, ce qui module la population des oligomères. Le cholestérol modifie les interactions entre les hélices en s'intercalant entre elles et il influence donc directement les contacts entre les protéines. Des études expérimentales montrent également le rôle d'inhibition du cholestérol dans la fonction de  $\beta$ 2AR, ce qui nuit au déclenchement de la cascade de signalisation dans le radeau lipidique (Pontier *et al.*, 2008).

### 4.3. Les récepteurs opioïdes et la membrane

Les récepteurs opioïdes ont aussi été étudiés expérimentalement avec le cholestérol. Les premiers travaux sont relativement anciens, ce qui s'explique par le débat sur l'existence des microdomaines dans les années 1990 et 2000.

Lagane et ses collaborateurs, en 2000, ont étudié en particulier l'influence du cholestérol sur la fonction du récepteur  $\mu$  (Lagane et al., 2000). Le récepteur  $\kappa$  est localisé dans les radeaux lipidiques dès 2006, ce qui affecte le couplage avec la protéine G (Xu et al., 2006). Un an après, on localise aussi le récepteur  $\mu$  dans ces microdomaines et le rôle dans le couplage récepteur/protéine G est corrélé à une diminution de la concentration en cholestérol (Huang et al., 2007).

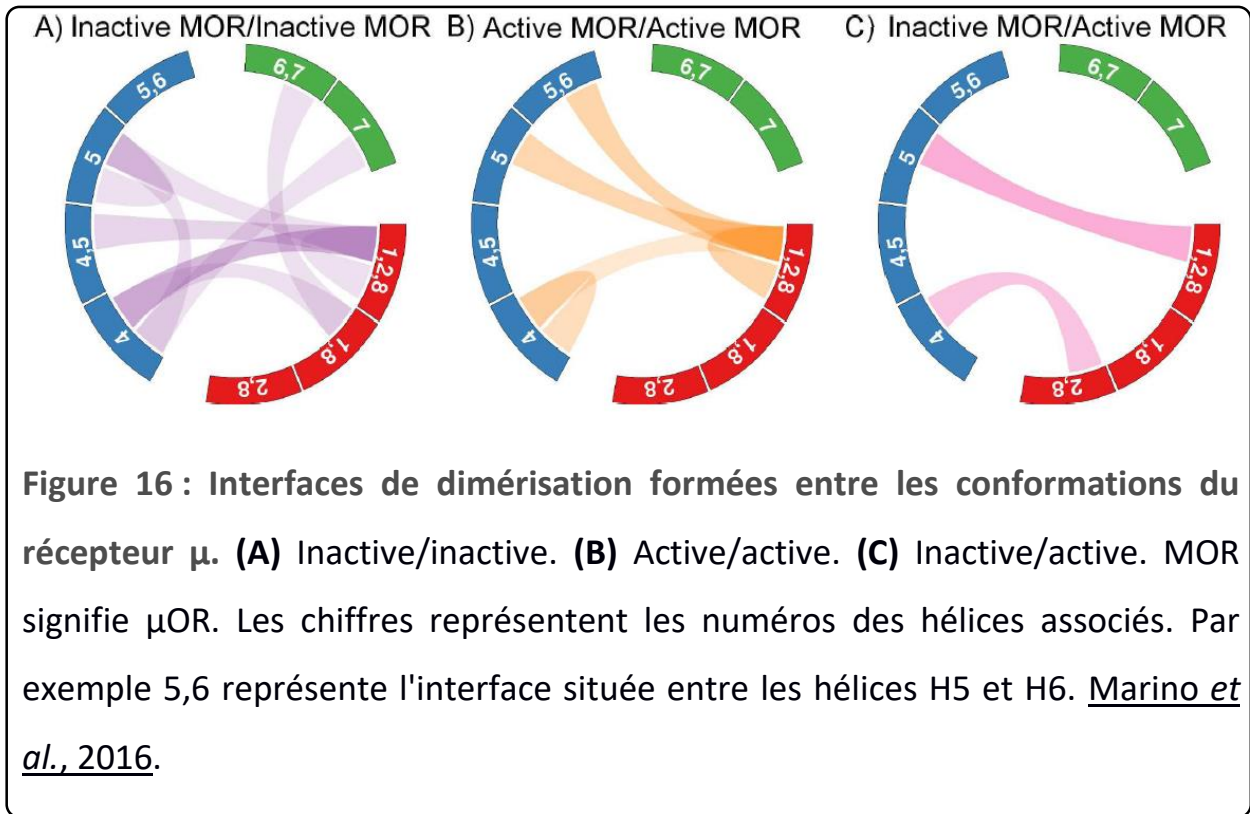
En 2008, deux publications illustrent l'effet du cholestérol sur le récepteur  $\mu$ . Il est notamment montré que le cholestérol induit des comportements pharmacologiques différents (Gaibelet et al., 2008) et que la sélectivité de l'agoniste est induite par la localisation de  $\mu$ OR dans les radeaux lipidiques (Zheng et al., 2008).

Une revue de Lopez et Salomé en 2009 présente de manière très complète les différentes études expérimentales menées pour prouver l'importance des radeaux lipidiques sur le récepteur  $\mu$  (Lopez et Salomé, 2009). Ils concluent sur deux modes de diffusion du récepteur dans la membrane : une diffusion directe impliquée dans la redistribution des récepteurs dans des sites spécifiques et une diffusion confinée qui favorise les interactions avec les partenaires de la cascade de signalisation intracellulaire. Dans l'année suivante, Saulière-Nzeh et ses collaborateurs, révélaient par des mesures de fluorescence, la

compartimentalisation des récepteurs  $\mu$  dans la membrane lorsqu'il était activé (Saulière-Nzeh *et al.*, 2010).

En 2012, l'homodimérisation des récepteurs  $\mu$  fut étudiée à la fois expérimentalement (co-immunoprécipitation, co-localisation d'immuno-fluorescence et transfert d'énergie de résonance de fluorescence) et théoriquement (Zheng *et al.*, 2012). Ces travaux ont ainsi mis en évidence le rôle du cholestérol et de la palmitoylation de la cystéine C170 (hélice H3, côté intracellulaire) dans la formation de l'interface H4/H4. Ces résultats ont montré que le palmitate formait une poche avec les hélices H3 et H4 qui accueille un cholestérol. Cette interaction entre un palmitate et un cholestérol a déjà été identifiée dans la structure cristalline du récepteur  $\beta$ 2AR (Cherezov *et al.*, 2008). Le cholestérol forme l'interface de dimérisation avec l'hélice H4.

En 2016, Marino et ses collaborateurs montrèrent l'importance de la composition lipidique de la membrane sur le récepteur opioïde  $\mu$  (Marino *et al.*, 2016). Pour cela, ils ont modélisé les deux conformations connues et cristallisées de  $\mu$ OR dans une membrane de soixante-trois lipides différents pour montrer les effets directs et indirects de la membrane sur le récepteur. Ils en ont déduit que l'enrichissement de sphingomyélines près des hélices H1, H5 et H6 promouvait les régions ordonnées alors que l'hélice H4 était plus souvent en contact avec des régions désordonnées à cause du mésappariement hydrophobique. La **Figure 16** présente les interfaces pouvant être formées entre deux récepteurs : inactif/inactif, actif/actif et inactif/actif.

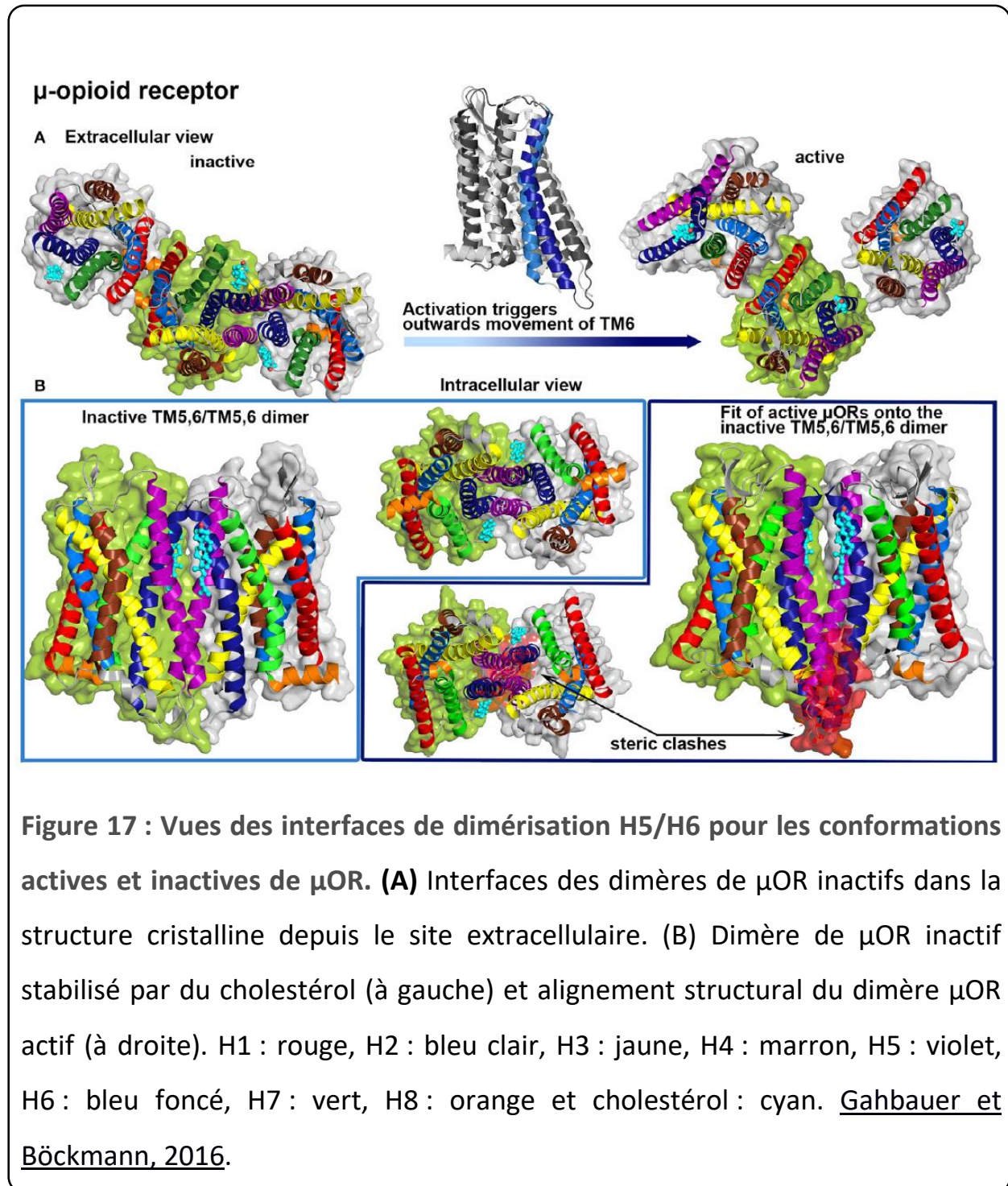


La **Figure 16** montre que les interfaces de dimérisation varient en fonction de la conformation de  $\mu$ OR en nombre et en type. On retrouve les interfaces suivantes dans les deux cas : H1/H2/H8-H1/H2/H8, H1/H2/H8-H4, H1/H2/H8-H5. Marino et ses collaborateurs montrent les effets indirects de la membrane sur la dimérisation du récepteur  $\mu$ .

Il est particulièrement intéressant de constater que l'augmentation du paramètre d'ordre des lipides et l'épaisseur de la membrane près de H4 augmente la probabilité de formation d'interface avec cette hélice pour la conformation inactive. Par contraste, le mouvement de l'hélice H6 après l'activation diminue la possibilité de former un dimère car le paramètre d'ordre des lipides et l'épaisseur de la membrane diminuent près de H6.



On peut ensuite montrer comment les différences d'interaction avec les lipides modifient l'interface de dimérisation potentielle H5/H6-H5/H6 pour les deux conformations active et inactive de  $\mu$ OR (**Figure 17**).





L'interface de dimérisation H5/H6-H5/H6 est stabilisée pour la forme inactive (**Figure 17**) par l'interaction des hélices H5 et H6 avec un cholestérol qui bloque la protéine dans une conformation favorable (Huang *et al.*, 2015). Ce n'est plus le cas dans la conformation active du récepteur  $\mu$  à cause de l'encombrement stérique entre les parties intracellulaires des deux hélices H5 et H6 (Gahbauer et Böckmann, 2016 ; Marino *et al.*, 2016). On peut expliquer cet encombrement par la modification de la structure secondaire de la boucle ICL3, située entre les hélices H5 et H6 (Huang *et al.*, 2016). Dans la conformation inactive, la boucle forme un feuillet  $\beta$  qui semble contribuer à la stabilisation de l'interface de dimérisation H5/H6-H5/H6. En revanche, le monomère et la forme active possèdent une hélice  $\alpha$ , ce qui est cohérent avec la structure cristalline du récepteur de la rhodopsine activé lié à la protéine G (Elgeti *et al.*, 2013).

Comme précisé dans la section suivante, dans notre travail de thèse, nous allons détailler les interactions spécifiques entre  $\mu$ OR et les lipides, ce qui devrait permettre à terme de faciliter le travail d'étude des interfaces de dimérisation tant au niveau théorique qu'au niveau expérimental.





# Objectifs

Comme nous l'avons montré dans l'Introduction, la compréhension du mécanisme d'activation du récepteur opioïde  $\mu$  constitue un enjeu majeur pour améliorer la conception de médicaments analgésiques. Dans ce cadre, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux interactions entre la protéine et son milieu lipidique par la DM GG.

Des calculs préliminaires effectués en TA ont eu pour but de valider les résultats du GG. En effet, les principaux résultats ont été obtenus en GG. Nous avons ainsi atteint des temps de calcul plus importants (5  $\mu$ s répétés trois fois) qui ont permis de réaliser des études statistiques. Les systèmes étudiés consistent en une membrane entourant le récepteur  $\mu$  et des molécules d'eau de chaque côté de la bicouche lipidique.

Nous avons développé deux axes de recherches en partant du constat qu'un lipide, le POPC, a déjà été particulièrement utilisé dans de nombreuses simulations de DM avant 2013, date correspondant au début de notre thèse, et encore à ce jour :

- (1) Nous allons étudier les interactions du POPC avec  $\mu$ OR ; ces études serviront de références pour les comparer ensuite au DPPC et au POPE. En particulier, le but est de comprendre l'effet du changement de tête lipidique (choline pour le POPC et éthanolamine pour le POPE), ainsi que l'impact de la saturation des chaînes acyles (lipide saturé pour le DPPC et insaturé pour le POPC).

(2) Le récepteur  $\mu$ OR a été cristallisé avec un cholestérol situé entre les hélices H6 et H7. De plus, il existe des sites CRAC et CARC pour le cholestérol qui ont été prédits théoriquement. Nous allons donc prospecter les sites d'interaction du cholestérol en nous basant sur les données expérimentales et théoriques existantes.

Les Résultats de la thèse sont articulés autour de ces deux axes de travail avec deux chapitres basés sur deux publications. Le Chapitre 1 est constitué de l'article : « *Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the  $\mu$  opioid receptor: A coarse-grained molecular dynamics study* » accepté le 26 février 2019 dans le journal PLoS One. Le Chapitre 2 par l'article : « *Cholesterol sites at the surface of the  $\mu$  opioid receptor: a coarse-grained molecular dynamics study* » soumis en 2019 dans Journal of Membrane Computing.





# METHODES



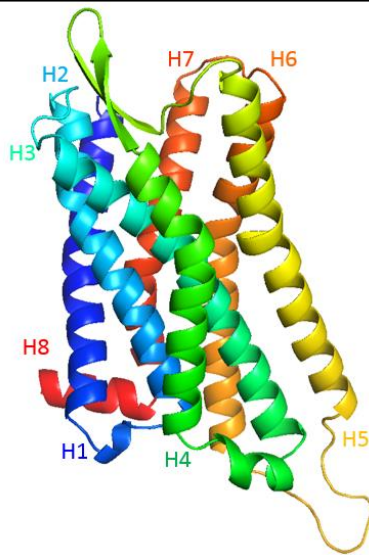


## 1. Systèmes moléculaires

La structure complète du récepteur  $\mu$ OR en tout-atomes (TA) a été obtenue par la diffraction aux rayons X des cristaux de protéines (Manglik *et al.*, 2012), disponible dans la PDB sous le numéro d'accèsion 4DKL. La protéine  $\mu$ OR est composée de 7 hélices transmembranaires (H1 à H7) et d'une hélice intracellulaire H8 (**Figure 1**). Deux feuillets  $\beta$  très courts sont formés dans la boucle extracellulaire ECL2. Les parties N- et C-terminale se trouvent dans le milieu extra- et intracellulaire respectivement. Ces deux parties n'ont pas été modélisées dans ce travail car elles n'interviennent pas dans les processus d'interactions protéine-lipides comme nous l'avons décrit dans l'Introduction.

L'hélice H3 est très inclinée dans la structure 3D du récepteur : la partie extracellulaire est située entre H2 et H4, alors que la partie intracellulaire est localisée entre H4 et H5. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction, les problèmes de cristallisation induisent une altération de la structure par le remplacement d'AAs (264 à 269) dans la boucle ICL3 (**Figure 6B**). Pour étudier la structure de la protéine dans son ensemble, Fossépré *et al.*, 2014 ont supprimé la chaîne du lysosyme T4 et ont reconstruit les AAs manquants en utilisant le logiciel Modeller (Sali et Blundell, 1993). Pour équilibrer la structure ainsi obtenue, une dynamique moléculaire a ensuite été réalisée afin de valider la structure finale du récepteur  $\mu$  entre les résidus Met 65 et Ile 352. La structure a enfin été modélisée avec le champ de forces CHARMM22, amendée ensuite par CHARMM36 (MacKerell *et al.*, 2004).

Pour créer les systèmes protéine-lipides, nous avons construit chaque membrane avec Charmm Builder ([Jo et al., 2008](#) ; [Wu et al., 2014](#)) et plus particulièrement Membrane Builder que l'on peut trouver sur le site : . Ce logiciel en ligne est régulièrement mis à jour pour tenir compte des dernières avancées des champs de forces TA pour CHARMM, NAMD, Gromacs ou encore OpenMM. Les lipides sont modélisés avec le champ de forces CHARMM36 ([MacKerell et al., 2004](#)).



**Figure 1 : Structure 3D du récepteur  $\mu$ OR.** Les hélices sont notées H1 à H8. On distingue les sept hélices transmembranaires (H1 à H7), l'hélice intracellulaire H8 et les deux feuillets  $\beta$  dans la boucle extracellulaire ECL2.

Un système complet est représenté par une boîte de simulation en conditions périodiques (reproduction de la boîte suivant les axes x, y et z) qui comprend une membrane, le récepteur  $\mu$ OR, des molécules d'eau et des ions. Les membranes considérées dans notre travail sont :

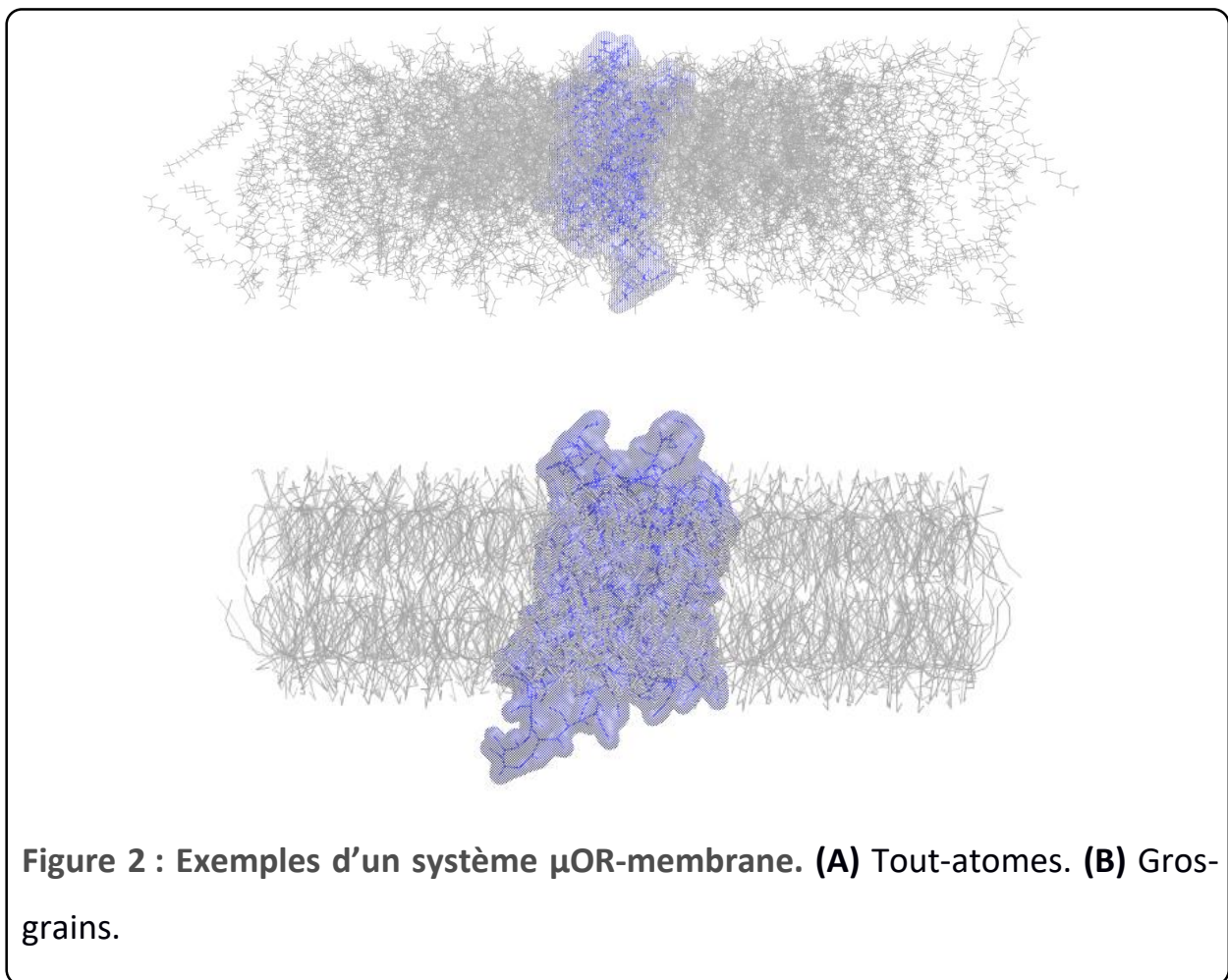
- Membranes de phospholipides purs : POPC (C), POPE (E) et DPPC (D) ;
- Membranes de phospholipides et 30 % de cholestérol : POPC + 30 % Chol (CCh), POPE + 30 % de Chol (ECh) et DPPC + 30 % de Chol (DCh).

Chaque membrane est composée de 600 lipides. Le récepteur est ensuite ajouté au centre de la membrane à l'aide des *scripts* inclus dans le tutoriel fourni par NAMD et qui ont été adaptés à nos systèmes ([https://gitlab.unamur.be/maanglad/protein-lipid\\_interaction\\_scripts](https://gitlab.unamur.be/maanglad/protein-lipid_interaction_scripts)), grâce au logiciel VMD (Humphrey *et al.*, 1996). On place la protéine au centre de la membrane et on enlève les lipides qui sont à moins de 3 Å des AAs. Puis on ajoute une couche d'eau de 25 nm de chaque côté de la membrane. Cette épaisseur est choisie pour bien recouvrir les boucles de la protéine et éviter des interactions d'une boîte à l'autre lors des simulations de DM. Enfin, le système est rendu neutre par l'ajout d'ions, soit 13 Cl<sup>-</sup>. La boîte de simulation finale a une taille de 200 x 200 x 90 Å.

## 2. Conversion du tout-atomes en gros-grains

Les systèmes protéine-lipides sont générés en TA. Il est possible d'effectuer les simulations de DM en TA sur des temps phénoménologiques mais elles prendraient trop de temps sur les systèmes de calculs à notre disposition. Avant de réaliser les études finales, nous avons effectué des tests pour augmenter la

rapidité du temps de calcul. 100 ns en TA demandent 1 mois de calcul sur le cluster de l'UNamur, Hercules. Pour obtenir des résultats fiables d'un point de vue statistique pour les interactions  $\mu$ OR-lipides et les mouvements des lipides, nous avons considéré qu'il était nécessaire d'atteindre des temps de simulation de minimum 1  $\mu$ s. Nous avons donc choisi de simplifier le système avec un champ de forces gros-grains (GG) appelé MARTINI, diminuant ainsi la taille d'un système de 100 000 atomes à 25 000 grains (**Figure 2**).

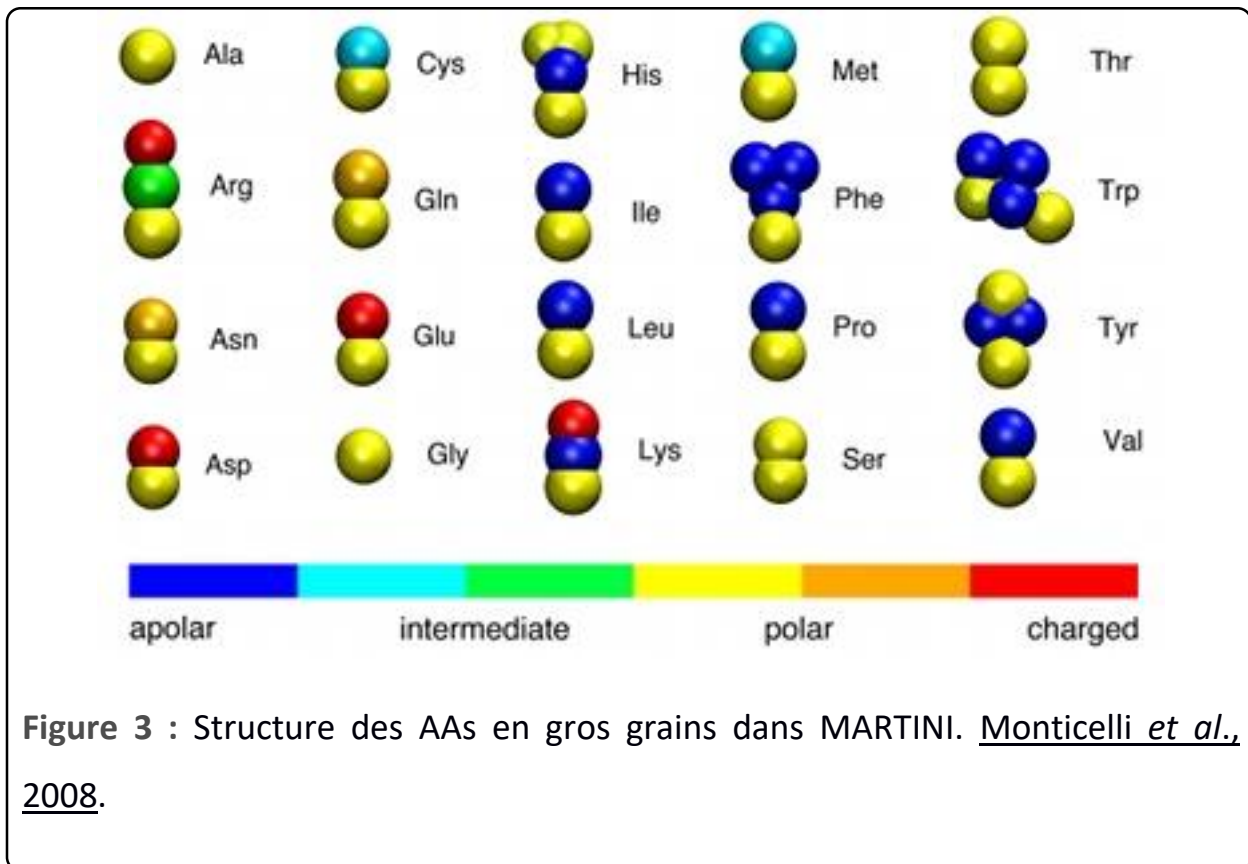


Avec le champ de forces GG choisi, 1  $\mu$ s de simulations de DM peut être réalisée en 1 mois. De plus, ce champ de forces a été conçu pour les lipides, puis étendu

aux protéines, ce qui correspond parfaitement à notre usage (Marrink *et al.*, 2004).

Tous les systèmes ont été transformés par le champ de forces MARTINI v2.1 en utilisant VMD (Marrink *et al.*, 2004 ; Marrink *et al.*, 2007 ; Monticelli *et al.*, 2008).

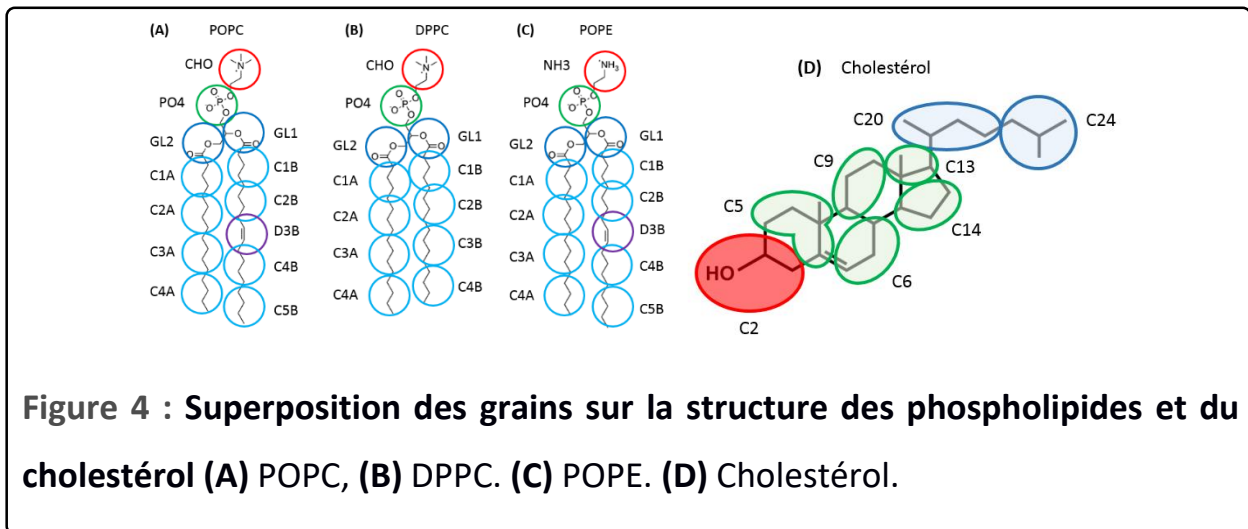
Dans MARTINI, les grains, comprenant 4 atomes, peuvent être classés selon les propriétés suivantes : polaire (P), non polaire (N), apolaire (C) et chargé (Q) (**Figure 3**).



Le POPC est représenté par 13 grains, dont deux grains Q pour la tête (choline et phosphate), deux grains N pour les fonctions esters et quatre à cinq grains pour chaque chaîne acyle (**Figure 4A**). Le DPPC diffère du POPC par la saturation : le grain D3B du POPC (l'insaturation de la chaîne B) est remplacé par le C3B dans le

DPPC et il y a un grain en moins à la fin de la chaîne B du DPPC (Figure 4B). Le POPC et le POPE ont les mêmes chaînes acyles ; seule la tête est modifiée : la choline (grain CHO) pour le POPC et l'éthanolamine (grain NH3) pour le POPE (Figure 4C).

Enfin, le cholestérol (Figure 4D) est représenté par un cycle simplifié formé par les grains C5, C6, C9, C13 et C14, une chaîne acyle formée de deux grains C20 et C24 et la fonction hydroxyle du cholestérol par le grain polaire C2.



### 3. Simulations de dynamique moléculaire

Afin d'appréhender les fluctuations de la structure de  $\mu$ OR en réponse aux mouvements de la membrane, nous avons choisi la dynamique moléculaire (DM) classique en gros-grains (GG) avec le logiciel NAMD. Nous avons préféré le logiciel NAMD (NAnoscale Molecular Dynamics) à GROMACS (GRONingen Machines for Chemical Simulations) pour réaliser les simulations de DM. La majorité des études réalisées relatives aux interactions protéine-lipides ont été faites avec GROMACS.

Il est cependant plus facile d'implémenter de nouvelles méthodes d'analyses avec NAMD qu'avec GROMACS. Nous avons ainsi pu comparer nos résultats avec ceux existants dans la littérature, tel que l'angle d'inclinaison des hélices de  $\mu$ OR et mettre en évidence de manière différente et nouvelle les interactions étudiées.

L'intérêt du GG est l'usage du champ de forces MARTINI qui a été développé en premier lieu pour étudier les lipides. Il a ensuite été complété pour les protéines. La diminution d'un facteur 4 (1 grain  $\approx$  4 atomes) du nombre d'éléments dans les systèmes moléculaires permet d'atteindre des temps de calculs qui n'étaient pas accessibles avec les systèmes de calcul à notre disposition. En revanche, ce champ de forces est rigide, ce qui augmente le temps d'interactions protéine-lipides. Nous avons choisi de réaliser des simulations de DM longues (5  $\mu$ s) et de les répéter trois fois. Les résultats des simulations en GG ont été comparés au TA pour une simulation de DM d'une durée d'1  $\mu$ s. Les résultats obtenus en TA et en GG sont comparables.

Le logiciel de simulation de DM que nous avons privilégié est NAMD. Un logiciel alternatif, GROMACS, est plus régulièrement utilisé pour les études protéine-membranes car il contient un ensemble d'outils d'analyses préétablies qui permet une comparaison aisée des résultats dans la littérature. Toutefois, il est très difficile d'ajouter des analyses complémentaires avec GROMACS, ce qui a orienté notre choix vers NAMD. En effet, ce logiciel de DM combiné au logiciel de visualisation VMD, permet de créer de nouvelles méthodes d'analyses tout en disposant d'un petit ensemble de *scripts* déjà établi pour les études de base. Nous avons ainsi eu la possibilité d'implémenter de nouvelles méthodes d'analyses



originales et inédites, tels que le nombre de contacts entre la protéine et les lipides pour chaque acide aminé (AA) de  $\mu$ OR.

L'originalité de notre travail réside dans la description détaillée des contacts entre chaque AA du récepteur et chaque lipide, ainsi que dans la méthode proposée pour analyser les mouvements des lipides. La méthodologie proposée est transposable à d'autres systèmes protéine-membrane ; elle est détaillée dans la partie suivante.

L'ensemble des scripts de création des systèmes en TA et GG, de configuration pour lancer les calculs de DM ainsi que d'analyse des systèmes sont présents sur le GIT de l'Université de Namur à l'adresse : .

Les calculs ont été effectués sur le cluster de l'UNamur entre 2014 et 2016. Les nœuds utilisés sont des Intel Sandy Bridge, avec 8 processeurs de 64 GB de RAM. A titre indicatif, pour la production des DMs en GG sur ce type de nœuds avec 8 processeurs, il faut compter un mois de calcul pour réaliser 150 ns de temps de simulation.

Les simulations de DM GG ont été réalisées avec le logiciel NAMD 2.8 (Phillips *et al.*, 2005). Pour supprimer les contacts initiaux non favorables, l'énergie potentielle totale du système a d'abord été minimisée avec la technique du gradient conjugué pour un nombre d'étapes maximal de 1000 (**Tableau 1**).

Puis, l'équilibrage du système a été effectué selon la résolution des équations de Langevin pour éliminer les contacts qui induisent de trop grandes énergies pendant 20 ns toutes les 10 fs en NVT (nombre de molécules, volume et température constants), puis trois fois 10 ns en augmentant la valeur de 10, 20 et 30 fs en NPT (nombre de molécules, pression et température constants).

L'équilibrage du système permet de mélanger les chaînes acyles des lipides et de réarranger les lipides dans la membrane et autour de  $\mu$ OR.

	Etapes d'intégration (fs)	Temps	Ensemble
<b>Minimisation</b>	1.000 étapes		
<b>Equilibrage</b>	10	20 ns	NVT
	10	10 ns	NPT
	20	10 ns	
	30	10 ns	
<b>Production</b>	30	1 à 5 $\mu$ s	

**Tableau 1** : Protocole des simulations de DM. NVT (nombre de molécules, volume et température constants). NPT (nombre de molécules, pression et température constants). P = 1.01325 bar et T = 310 K.

Nous avons comparé les résultats obtenus pour 1  $\mu$ s en TA et pour 5  $\mu$ s en GG. Ils se sont avérés identiques, tel qu'expliqué dans le Chapitre 1 des Résultats. Par la suite, nous avons effectué les simulations de DM GG pendant 1  $\mu$ s. Dans tous les cas, les calculs sont répétés trois fois à des fins statistiques.

#### 4. Méthodes d'analyses

Les résultats de DM ont été analysés après alignement de chaque étape sur la structure de  $\mu$ OR avec le programme Carma ([Glykos, 2006](#)). Le modèle MARTINI étant rigide, nous avons considéré que les mouvements étaient réduits et que le système était suffisamment stable pour enregistrer les résultats d'une étape toutes les  $10^6$  itérations. Le RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de la protéine au

cours de la simulation a été calculé pour chaque système lors de l'équilibrage et de la production. Pour valider notre choix de méthode du GG par rapport au TA, nous avons montré que le RMSD pour chaque hélice de la protéine était peu différent selon la méthode employée et que les différences étaient dues aux courbures de l'hélice comme la Proline 244 dans l'hélice H5.

Le plugin Bendix ([Dahl et al., 2012](#)), de VMD (Visual Molecular Dynamics), ([Humphrey et al., 1996](#)) a été utilisé pour calculer l'angle maximum de chaque hélice de  $\mu$ OR, l'angle *tilt*. Globalement, les hélices pivotent autour des AAs situés au milieu de la membrane. Nous avons choisi ce *plugin* à des fins de comparaison avec la littérature. L'étude des angles *tilt* a aussi été réalisée avec des *scripts* écrits au cours de la thèse afin de visualiser au cours du temps l'inclinaison des hélices.

Un grand nombre de *scripts* Python3, présents dans le GIT, ont été écrits pendant la thèse pour combler les lacunes d'analyses des interactions protéine-membrane de NAMD. Etant donné que le travail a été réalisé en GG, on parle de contacts entre les grains d'AAs et de lipides et non de distances. Dans la littérature, un contact est établi pour une distance calculée de 0.6 nm ([Sengupta et Chattopadhyay, 2012](#)). Etant donné la quantité importante de données, nous avons réduit le critère à 0.5 nm comme de Jong et ses collaborateurs pour étudier les interactions protéine-lipides avec MARTINI ([de Jong et al., 2012](#)). Nous avons ensuite déterminé la fréquence de contacts pour chaque AA avec les lipides qui l'entouraient. Nous avons projeté ces données sur la structure primaire du

récepteur  $\mu$ OR en utilisant un code couleur, du jaune (pas de contacts) au rouge (100 % de contacts).

Pour obtenir une image de la structure primaire de la protéine membranaire, nous avons utilisé une image vectorielle en *svg*. Il est possible de créer cette image sur internet en utilisant le site suivant : <http://vectorpaint.yaks.co.nz/>. Le résultat par défaut ne permet pas de respecter la définition des hélices membranaires (4 AAs par pas d'hélice). Pour ces raisons, la structure primaire du récepteur  $\mu$ OR a été redessinée avec des formes vectorisées grâce au logiciel Framasoft (<https://framasoftware.org>). On peut ainsi colorer les AAs en associant des valeurs au code couleur de notre choix.

Pour illustrer les mouvements des lipides à la surface de la protéine, nous avons utilisé Gephi 9.2 ([Bastian et al., 2009](#)), un logiciel de visualisation de graphes en réseau. Nous avons utilisé les paramètres par défaut dans notre travail avec l'algorithme ForceAtlas2 ([Jacomy et al., 2014](#)), et une force de répulsion de 20 000. Pour détecter les *clusters* d'hélices, nous avons considéré la méthode de Louvain implémentée dans Gephi ([Blondel et al., 2008](#)). Pour détecter la fiabilité du *clustering*, le coefficient doit être supérieur à 0.4. Les *clusters* sont réunis par couleur. Dans notre cas, il est de 0.8, permettant ainsi de bien détecter les communautés. Enfin, les nœuds qui présentent moins de 10 connections avec l'ensemble de la communauté ont été supprimés. Le faible nombre de liens indique que ces nœuds sont peu fréquentés.

Les paramètres d'entrée ont été définis sur base de l'étude des contacts  $\mu$ OR-lipides. Nous avons considéré que les interactions protéine-lipides les plus

importantes étaient celles entre le récepteur et l'anneau lipidique. Pour définir cet anneau, nous avons considéré les lipides qui interagissent au moins 20 % du temps de simulation avec la protéine. Pour chacun de ces lipides, nous avons relevé les numéros des AAs situés à 0.5 nm et nous les avons associés au numéro de l'hélice auxquels ils appartiennent à chaque étape de la simulation de DM. On obtient ainsi un numéro de poche, par exemple 1 pour représenter la poche qui accueille le lipide situé près de l'hélice H1 et 167 pour représenter la poche qui accueille le lipide au sein de H1, H6 et H7. Lorsqu'un lipide interagit plusieurs fois avec une ou plusieurs hélices de manière consécutive, nous avons comptabilisé une seule fois le numéro pour éviter la redondance et mieux visualiser les mouvements d'un lipide d'un site à l'autre.

Ces données ont ensuite été utilisées pour générer les graphes en réseau avec Gephi en fonction de la composition de la membrane pour déterminer quels sont les sites, représentés par les numéros d'hélices, qui sont le plus souvent visités par les lipides et le chemin parcouru par les lipides autour de  $\mu$ OR. Les sites sont représentés par des cercles et les chemins entre eux, par des traits. Plus un nœud ou un chemin est gros ou épais et plus il est fréquenté par les lipides. Nous avons distingué les lipides de la couche externe et ceux de la couche interne de la membrane, la composition lipidique variant selon leur localisation dans la bicouche lipidique.

Les paramètres présentés dans ce travail de thèse ne sont pas exhaustifs. Certaines analyses n'ont pas donné lieu à une exploitation satisfaisante des

résultats, comme l'épaisseur de la membrane autour de la protéine ou l'étude de la poche du ligand (forme et volume) au cours du temps.

Dans le premier cas, il n'était pas possible d'extraire des données d'épaisseur de la membrane autour du récepteur selon les hélices. Cette information aurait été complémentaire à la déformation de la structure de  $\mu$ OR que nous avons observée par le biais de l'angle d'inclinaison des hélices, l'angle tilt.

Dans le second cas, le logiciel de suivi des poches (POCASA) ne permettait pas de tenir compte de la fragmentation de la poche du ligand en deux ou trois poches plus petites. De plus, des poches très petites peuvent se former dans la partie extracellulaire de la protéine ; elles correspondent aux poches allostériques des ligands. Le second logiciel envisagé, mdpocket, qui permet un suivi dynamique des poches au cours du temps ne fonctionne que pour des systèmes en TA et il était impossible de l'adapter à un système GG.



# RESULTATS





## **Références**

Angladon M-A, Fossépré M, Leherte L, Vercauteren DP (2019) Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the  $\mu$  opioid receptor: A coarse-grained molecular dynamics study. PLoS ONE 14(3): e0213646.

## **Contribution**

Marie-Ange Angladon : conception des analyses, calculs, analyses, visualisation et écriture

Mathieu Fossépré : méthodologie de la dynamique moléculaire

Laurence Leherte : révision et édition

Daniel P. Vercauteren : révision, édition et supervision

Chapitre 1 : Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the  $\mu$  opioid receptor: A coarse-grained molecular dynamics study

Les pages 89 à 127 correspondent à celles intégralement publiées dans PLoS One le 14 mars 2019.



# Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the $\mu$ opioid receptor: A coarse-grained molecular dynamics study

Marie-Ange Angladon<sup>1\*</sup>, Mathieu Fossépré<sup>1</sup>, Laurence Leherte<sup>1</sup>, Daniel P. Vercauteren<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physico-Chimie Informatique, Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale, Namur Medecine and Drug Innovation Center (NAME DIC), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur (UNamur), Namur, Belgium

\* Corresponding author

E-mail: marie-ange.angladon@unamur.be

**Keywords:** molecular dynamics; coarse-grain; GPCR;  $\mu$  opioid receptor; phospholipids.

**Abbreviations:** 3D (three-dimensional), AA (amino acid), CG (coarse-grained), DPPC (1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), EL (extracellular loop), FF (force field), GPCR (G protein-coupled receptor), Hi (helix i), IL (intracellular loop), MD (molecular dynamics), PDB (Protein Data Bank), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine),  $\mu$ OR ( $\mu$  opioid receptor), TM (transmembrane).

## 1. Abstract

The  $\mu$  opioid receptor ( $\mu$ OR), which is part of the G protein-coupled receptors family, is a membrane protein that is modulated by its lipid environment. In the present work, we model  $\mu$ OR in three different membrane systems: POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), and DPPC (1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) through 45  $\mu$ s molecular dynamics (MD) simulations at the coarse-grained level. Our theoretical studies provide new insights to the lipid-induced modulation of the receptor. Particularly, to characterize how  $\mu$ OR interacts with each lipid, we analyze the tilt of the protein, the number of contacts occurring between the lipids and each amino acid of the receptor, and the  $\mu$ OR-lipid interface described as a network graph. We also analyze the variations in the number and the nature of the protein contacts that are induced by the lipid structure. We show that POPC interacts preferentially with helix 1 (H1) and helices H5-H6, POPE, with H5-H6 and H6-H7, and DPPC, with H4 and H6. We demonstrate how each of the three lipids shape the structure of the  $\mu$ OR.

## 2. Introduction

Opioid receptors, whose crystallographic structures were revealed in 2012 [1-3], are part of the largest group of integral membrane proteins, the G protein-coupled receptors (GPCRs) superfamily [4]. The structure of GPCRs consists of seven  $\alpha$ -helices (H1-H7), followed by a short helix (H8), separated by three extracellular loops (EL1-EL3), and three intracellular loops (IL1-IL3). The N-terminal and C-terminal domains are located at the extra- and the intracellular side, respectively. The opioid receptors are divided in three subtypes:  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$ . Protein  $\mu$  is the most important for the treatment of pain with morphine and

opiate alkaloids. These drugs are addictive and their clinical efficacy is limited by side effects such as dependence and tolerance [5].

Protein/lipid interactions influence the membrane protein functions through conformational changes [6-9]. There are thousands of lipids in a plasma membrane, and properties such as their length, the saturation, and the nature of the head groups are essential to understand their functions [10]. For example, several biochemical experiments demonstrated the role of cholesterol on the GPCRs [11, 12]. Particularly, Zheng and its collaborators [13] considered the interactions between cholesterol and the  $\mu$  opioid receptor ( $\mu$ OR) signaling complex with a new method involving an antibody. The crystal structure of  $\mu$ OR crystallized with cholesterol has been solved in 2012 [2]. To crystallize a membrane protein, it is necessary to remove most of the surrounding lipids. Only the tightest bound lipids are found in the final structure, as illustrated by Kobilka and Schertler for the  $\beta$ 2 adrenoceptor and rhodopsin [14]. The location of weaker lipid binding sites is therefore usually observed using classical molecular dynamics (MD).

To apprehend interactions between membrane proteins and lipids, MD has indeed been shown as a theoretical method of choice [15, 16]. As examples, one can cite the MD studies focused on the well-known rhodopsin receptor embedded in a membrane composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and cholesterol [17, 18]. Both researches demonstrated the role of the lipids on the structure and function of the rhodopsin receptor. Since several years, MD methods have thus largely proven their efficiency in the investigation of GPCRs [19-22] and they are proven their efficiency as they reproduced experimental results [23].

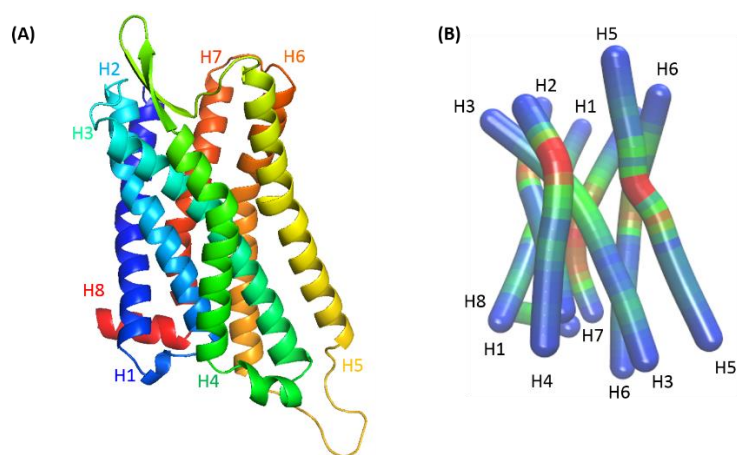
To reach longer simulation times, the MARTINI coarse-grained (CG) model is often preferred to all-atom. Many simulations are made with coarse-grained model to study GPCRs-lipid interactions, as cholesterol binding sites for serotonin 1A [24]. Rhodopsin dimerization interfaces have been observed and confirmed by biochemical cross-linked experiments [25]. Recently, Marino *et al.*, performed CG MD simulations with active and/or inactive  $\mu$ OR in multi-component membranes [26]. The type of  $\mu$ OR interfaces are induced by the shape complementarity between conformations, indirect lipid effects play a role in receptor oligomerization.

In the present paper, we apply CG classical MD simulations to study  $\mu$ OR-lipid interactions over long simulation times. The speed of calculation time in CG allows to conduct long simulations and repeat them which is necessary for the analysis of protein-lipid interactions. We consider  $\mu$ OR embedded in three types of membranes: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), and 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC). These three lipids are chosen in accordance with the majority proportion of lipids in the plasma membrane. Phospholipids represent near of 50 % of the lipids and among them, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are the main ones [10].  $\mu$ OR-POPC will serve as the reference system for comparisons with DPPC, a saturated lipid, and POPE, which presents a different head group, *i.e.*, ethanolamine. The POPE membrane highlights the role of the head group on the positioning of the acyl chain against the protein, while the saturated lipid, DPPC, constrains the receptor and hence promotes contacts between the lipids and the protein. Our results, put together, demonstrate the crucial role of the membrane composition on the conformational changes of  $\mu$ OR.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Molecular systems

The complete all-atom structure of  $\mu$ OR, already described in [27], was obtained from the X-ray diffraction structure [2] available in the PDB (ID: 4DKL) and further modelled with the CHARMM22 in conjunction with CHARMM36 force field (FF) [28]. The protein is composed of 7 transmembrane helices (H1 to H8) and an intracellular helix 8 (Fig 1). H3 is located between H2 and H4 in the extracellular and between H4 and H5 in the intracellular part. Helix H5 is divided into two parts by the P244 which induces a torsion angle.



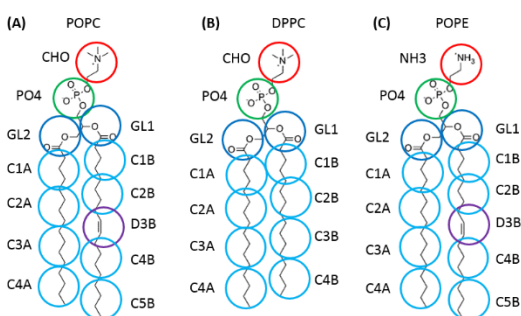
**Fig 1. Schematic structure of  $\mu$ OR.** Notations of the 7 transmembrane helices (H1 to H7) and the intracellular helix H8. **(A)** Ribbon representation. **(B)** Bendix representation, ranging from blue (no helix tilt) to red (maximum helix tilt).

To set up the supramolecular protein-lipid system, three membrane models, constituted of POPC, DPPC, or POPE molecules were generated with the Charmm Builder [29]. The  $\mu$ OR receptor was then embedded in each membrane composed of 600 lipids, solvated with water (25 Å above and below the



membrane) and neutralizing counterions (13 Cl<sup>-</sup>), for a simulating box of 200 x 200 x 90 Å with VMD scripts [30] A comparison in terms of AA and CG systems of all three considered systems is given in S1Table 1.

The so-obtained AA systems were then transformed into MARTINI v.2.1 CG representations, using VMD [31-33]. In the MARTINI FF, there are four basic interaction sites: polar (P), nonpolar (N), apolar (C), and charged (Q) [33]. POPC is modelled here with a 13-beads model with two Q beads representing the zwitterionic head groups, two N beads for the ester groups, and four to five C beads for the two fatty acyl chains (Fig 2A). DPPC differs from POPC by one C bead in one of the two acyl chains (Fig 2B). The head group of POPE differs from POPC as it includes an ethanolamine bead (Fig 2C). DPPC and POPC have similar heads but different tails; in POPC, the D3B beads correspond to an unsaturation in tail B (Fig 2A), whereas in DPPC, both saturated tails involve a C3 bead (Fig 2B). DPPC is a smaller lipid than POPC and POPE with no C5B bead.



**Fig 2. Superimposition of the heavy atoms and MARTINI beads of lipid. (A) POPC, (B) DPPC, and (C) POPE.**

### 3.2. Molecular Dynamics simulations

The CG MD simulations were performed with the NAMD 2.8 package [34]. To remove initial unfavorable contacts, the total potential energy of the systems was first minimized using a conjugate gradient approach with a maximal number of 1,000 steps (Table 1). Then, a series of equilibration steps using Langevin dynamics was performed to further remove contacts that led to high energy values, first during 20 ns with a time step of 10 fs in NVT conditions, and then during 3 x 10 ns with a progressively increased time step value, *i.e.*, 10, 20, and 30 fs, in NPT conditions. The equilibration was needed to melt the lipid tails and let the lipids rearrange correctly in the membrane and around  $\mu$ OR. Finally, the  $\mu$ OR-POPC,  $\mu$ OR-DPPC, and  $\mu$ OR-POPE systems were simulated for 5  $\mu$ s MD at P = 1.01325 bar and T = 310 K. Each production run was repeated three times and results were averaged for statistical purpose.

For information, the MD simulation protocol for the AA system is explained in S2 Table.

**Table 1. Protocol of the coarse-grained MD simulations.**

	Integration step (fs)	Time	Ensemble
<b>Minimization</b>	1,000 steps		
<b>Equilibration</b>	10	20 ns	NVT
	10	10 ns	NPT
	20	10 ns	
	30	10 ns	
<b>Production</b>	30	5 $\mu$ s	

### 3.3. Analysis methods

The MD results were analyzed after alignment of all saved system frames on the  $\mu$ OR structure with the program Carma [35]. Due to the rigid MARTINI model, we

consider that  $\mu$ OR conformations are sufficiently stable to allow path calculations from MD frames saved every  $10^6$  iterations.

The Bendix plugin [36], part of VMD, was used to evaluate the maximum tilt angle of the receptor helices. This plugin uses a sliding window of four residues, along the predefined helix, to give local helix axes that are joined by a spline. It is therefore possible to study helix torsions more realistically. The helices globally rotate around the AAs located in their middle.

In-house Python3 scripts were written to measure the distance between beads of the protein and beads of the lipids. Contacts were indeed established between lipids and protein when the distance is less than 0.6 nm [24]. To consider a contact between two beads in our work, a distance criteria of 0.5 nm was selected as in the work of de Jong *et al.* who also studied protein-lipid interactions using the MARTINI model [37]. In our work, we took into account three distances to study the contacts between the protein and the lipid beads: 0.5, 0.6, and 0.7 nm (S1 Fig). We did not observe any differences between the relative number of contacts at each of the three distance values. As an example, the number of contacts between the POPC beads and F204 amounts to 2,867 contacts below 0.5 nm, 2,329,544 contacts below 0.6 nm, and 3,592,610 contacts below 0.7 nm. Even if the numbers obviously differ, their relative occurrence frequencies yield similar figures. Moreover, on a purely visual aspect, the large number of contacts formed by the most interacting AAs tends to hide the contacts formed by the least interacting AAs. The color contrast is better with a distance contact of 0.5 nm and such a cutoff distance does not lead to any loss of information.

We determined the contact frequency between each amino acid (AA) and each surrounding lipid, each AA being colored by its contact frequency with lipids on the primary structure representation.

Finally, we used Gephi [38] to analyze the lipid sites at the  $\mu$ OR surface. Gephi is a graph visualization software that allows to display results in terms of graphs or networks. We used the default parameters of Gephi and defined the input parameters as follows. For each lipid that interacts with  $\mu$ OR at least 20 % of the MD simulation time, helices located at a distance shorter than 0.5 nm were searched, for each MD frame. Each contact was then defined by each helix number. Identical successive helix numbers were deleted to visualize the lipid movements from one visited site to another. The data associated to all lipids were considered to generate networks, as a function of the membrane composition, in order to determine the protein sites visited by the lipids and the paths they follow, represented by the nodes and connections. Both node and path size values are proportional to their browse frequency. Lipid movements in the internal and in the external leaflets of the membrane were separated. In addition, Gephi allows to depict each output network in terms of clusters, as described in the Louvain methods with a modularity coefficient of 0.8 [39].

## 4. Results

### 4.1. Comparison between AA and CG methods

In this part, we compare the results obtained from a CG and an AA simulation of  $\mu$ OR embedded in a POPC membrane. As the CG model was directly obtained from the AA model, we compare the behavior of the same system with two different simulation methods.

We first conducted AA and CG simulations of the lipid membranes to verify the bilayer properties, before conducting the GPCR-lipid MD simulations. As an example, we observed that the area per POPC molecule is equal to  $67.68 \text{ \AA}^2$  for

the CG MD simulation, to be compared to the reference value of 68.3 Å<sup>2</sup> [cfr Web site of membrane builder].

We also calculated the RMSD for  $\mu$ OR and for each helix (Table 2).

**Table 2. RMSD comparison for each  $\mu$ OR helix embedded in POPC membrane.**

The RMSD is obtained from the 1 $\mu$ s AA MD run at P = 1.01325 bar and T = 310 K and the 5  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K.

Helix	AA begin - AA end	RMSD (AA)	RMSD (CG)
H1	65-95	2.37	2.88
H2	103-130	1.55	2.86
H3	138-169	1.88	2.80
H4	180-204	1.65	2.87
H5	226-257	1.58	3.36
H6	273-304	2.25	4.21
H7	312-340	2.28	2.85
H8	341-352	1.80	3.46

As can be seen in Table 2, the differences between the RMSD from the AA and CG simulations are not significant for the H1, H2, H3, H4 and H7 helices. The deviation is higher for the H5, H6 and H8 helices. Indeed, the initial structure is very constrained because of the crystallization technique as compared to the structures resulting from the MD. In addition, H5 is bent due to the P244, as shown in Fig 1.

Finally, a comparison was made to validate the structural variations by the calculation of the angles of each helix of  $\mu$ OR obtained by both AA and CG simulations. We have chosen to show the starting point with the  $\mu$ OR tilt angles in the crystal structure (Table 3).

**Table 3. Tilt angle, using Bendix, for  $\mu$ OR embedded in POPC membrane.** The average tilt angles are obtained from the 1 $\mu$ s AA MD run at P = 1.01325 bar and T = 310 K and the 5  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K.

Helix	Crystal structure tilt (°)	Average tilt, AA (°)	Average tilt, CG (°)
H1	14.95	12.29 $\pm$ 2.71	17.1 $\pm$ 1.7
H2	7.54	14.25 $\pm$ 3.73	14.2 $\pm$ 1.0
H3	9.84	12.09 $\pm$ 2.53	15.2 $\pm$ 0.8
H4	24.03	21.89 $\pm$ 5.25	19.5 $\pm$ 0.8
H5	17.59	22.02 $\pm$ 4.56	55.7 $\pm$ 7.1
H6	17.90	19.50 $\pm$ 3.32	17.1 $\pm$ 1.6
H7	18.92	19.20 $\pm$ 2.65	15.2 $\pm$ 0.7
H8	7.09	7.19 $\pm$ 3.25	9.8 $\pm$ 0.3

As mentioned earlier, we focused more on the location of helix H3 than on its tilt value. H3 is located between H2 and H4 in the extracellular part and between H4 and H5 in the intracellular part (Fig 1A). It is particularly important for the understanding of the lipid sites at the protein surface as discuss later. The figures reported in Table 3 show that the mean tilt values calculated from both the AA and CG simulations are comparable to the experimental values. The average tilt of helix H5 is an exception with a value of 55.7° for the CG simulation and 22.02° for the AA one.

In the GPCR family, P244 of H5 is known to induce a strong deformation of the helix. It is therefore necessary to calculate the tilt angle of the part before and after the deformation. Helix H5 consists of two parts, separated by 4 amino acids, A240 to P244, shown in Fig 1B. To better understand the difference in tilt angles between the AA and CG methods, we measured the tilt for the W226 - A240 part and the P244 - L257 part (Table 4).

**Table 4. Tilt angle of H5, with standard deviations for the  $\mu$ OR embedded in POPC membrane.** The tilt angle is obtained from the 1 $\mu$ s AA MD run at P = 1.01325 bar and T = 310 K and the 5  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K.

<b>AA begin – AA end (H5)</b>	<b>AA method (°)</b>	<b>CG method (°)</b>
<b>226-240</b>	9.82 $\pm$ 3.79	11.74 $\pm$ 4.62
<b>244-257</b>	8.55 $\pm$ 2.77	12.12 $\pm$ 5.12

The tilt angles for AA and CG methods are remarkably similar, as shown in Table 4. The difference observed in the tilt angle of the entire helix is explained by the H5 torsion at the P244, which is more important for the CG system than for the AA one.

Although the CG is more rigid than the AA system, it can be seen that the CG model is sufficiently close to the results obtained for an AA system; it confirms the interest of using the CG simulations compared to the AA simulations.

#### 4.2. Tilt angle of the $\mu$ OR helices

As already mentioned in the previous part, an important aspect of the GPCR conformations is their helix tilt angles (Table 5). A detailed analysis of the tilt angle of  $\mu$ OR in each membrane, and particularly, the tilt of each helix, shows that both entities of the supramolecular complex adapt one to each other by minimizing their polar contacts.

**Table 5. Maximum tilt angles, with standard deviations, of each helix of  $\mu$ OR.**

They are calculated using the Bendix plugin of VMD for POPC, DPPC, and POPE systems, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K.

Helix	POPC	DPPC	POPE
H1	17.1 $\pm$ 1.7	18.7 $\pm$ 0.7	18.1 $\pm$ 0.8
H2	14.2 $\pm$ 1.0	15.0 $\pm$ 0.9	14.6 $\pm$ 0.9
H3	15.2 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 0.5
H4	19.5 $\pm$ 0.8	18.4 $\pm$ 2.2	16.6 $\pm$ 0.4
H5	55.7 $\pm$ 7.1	63.7 $\pm$ 5.0	49.8 $\pm$ 9.5
H6	17.1 $\pm$ 1.6	19.6 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 0.8
H7	15.2 $\pm$ 0.7	14.2 $\pm$ 1.2	14.7 $\pm$ 1.3
H8	9.8 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.5

All three types of lipids have a similar effect on the  $\mu$ OR conformations. Indeed, the tilt angle values varies between 10 and 20°, except for helix H5 which is characterized by a larger range of angle values, *i.e.*, from 40 to 70°. Error bars for helix H5 are comprised between 5 and 9.5°, whereas for the other helices, they are between 0.1 and 2.2°. Helix H5 is one of the longest helix with 32 AAs, as well as in H1, H3, and H6. H5 has a marked flexibility due to the kink proline Pro 244 and longer extra- and intracellular loops compared to the other helices (Fig 1). The larger tilt angle value and the high degree of freedom of H5 allow to minimize the polar AAs exposition towards the lipid environment. Table 5 also shows that the H5 tilt is smaller for  $\mu$ OR embedded in POPE and larger in DPPC compared to our reference lipid, POPC. Helix H5 is twisted at P244, the torsion zone is defined by A240 to P244. Table 6 indicates the results obtained for the tilt angles of the first and second part of the H5, defined by W226 - A240 and P244 - L257.



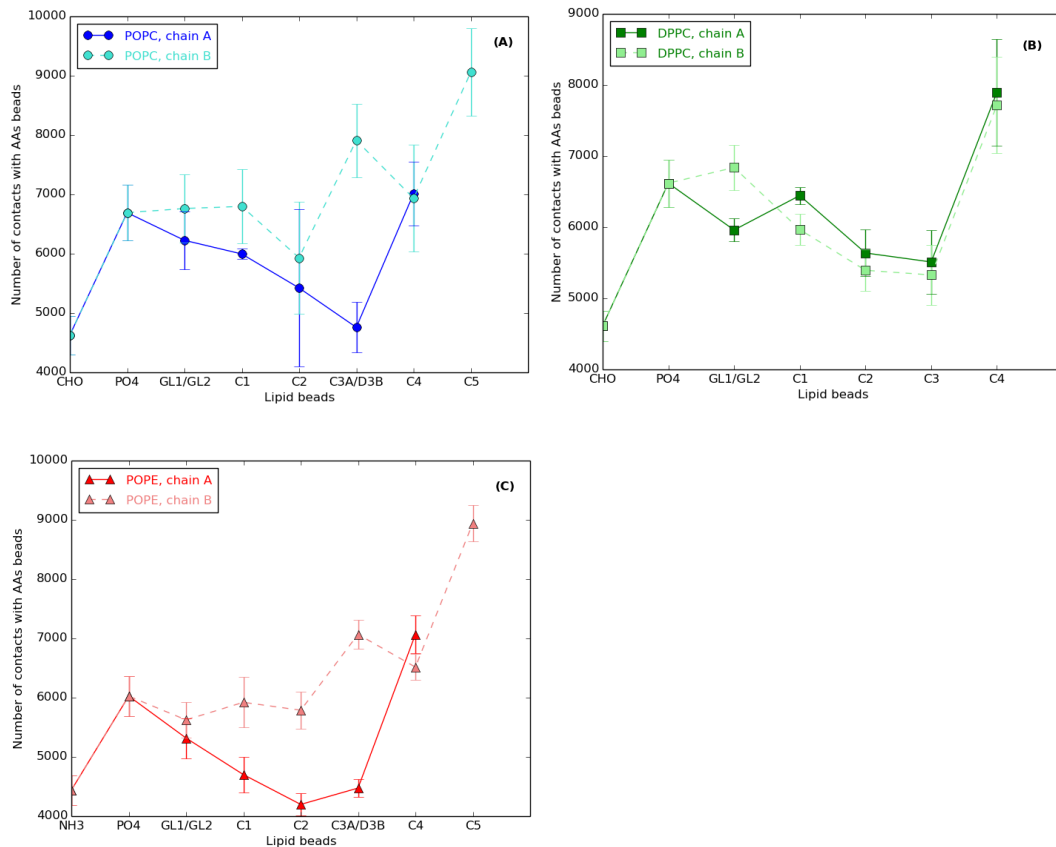
**Table 6. Tilt angle of the two parts of helix H5 with standard deviation.** They are calculated using the Bendix plugin of VMD for POPC, DPPC, and POPE systems, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K.

AA begin – AA end (H5)	POPC (°)	DPPC (°)	POPE (°)
<b>W226 - A240</b>	11.79 $\pm$ 0.16	12.60 $\pm$ 0.71	11.84 $\pm$ 0.94
<b>P244 - L257</b>	11.47 $\pm$ 0.62	15.35 $\pm$ 6.91	12.2 $\pm$ 0.45

Table 6 shows that the inclination of the helix H5 is larger for the second half of the helix (P244 - L257), which is illustrated by the average tilt angle value of 15.35° instead of 11.47° and 12.2° for the POPC and the POPE respectively. The DPPC tail is shorter than the POPC ones (Fig 2). The thickness of the DPPC membrane is smaller (38 Å for DPPC and 42 Å for POPC). Helix H5 is thus more inclined and the protein is compressed in the membrane. These first results demonstrate the role of each lipid towards the protein conformations.

#### 4.3. Effect of the lipid structure on the number of interactions with the $\mu$ opioid receptor

Each lipid interacts differently with  $\mu$ OR depending on their structure. To understand the effects of the different parts, for example the lipid heads (regarding choline or ethanolamine) and the acyl chain (regarding the saturated or unsaturated chain), we counted the contacts between each  $\mu$ OR bead and each lipid bead along each MD run (Fig 3).



**Fig 3. Number of contacts between each protein bead and each lipid bead type. (A) POPC, (B) DPPC, and (C) POPE, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K. The D3B bead in POPC and POPE is replaced by a C3B in DPPC. Lines between the points are present to guide the reading of the graphs.**

From Fig 3, it is first seen, that for all lipids, the CHO/NH3 beads form less contacts with  $\mu$ OR than the PO4 one. It is due to the negative charge brought by PO4, which interacts with the positively-charged  $\mu$ OR surface AAs, contrarily to the CHO/NH3 beads that are positively charged.

The differences in the contact numbers involving the lipid acyl chain beads are not clearly marked. Indeed, error bars are relatively large and prevent chain A to be strictly differentiated from chain B, particularly from the GL to C2 beads for POPC and DPPC (Fig 2). There are less contacts with  $\mu$ OR for POPE than POPC from PO4 (with 6,026 and 6,691 contacts, respectively) to C2B (with 5,788 and 5,931,

respectively) and C2A (4,198 and 5,423 contacts, respectively). The two chains of POPE behave differently regarding the number of contacts they form with the receptor. A strong and selective interaction between  $\mu$ OR and POPC for the D3B beads is observed, about 7,910 contacts compared to  $\mu$ OR and POPE, about 7,068 contacts. In all other cases, C3 beads form fewer contacts with  $\mu$ OR, *i.e.*, only 5,328 contacts are formed between the protein and C3B in DPPC (Fig 3B). It is actually due to the unsaturated bead D3B in POPC (Fig 3), which involves a *cis* double bond with an average C2B-C3B-C4B angle of 120°, and a decrease of the lipid chain stiffness. The membrane fluidity that is affected by the lipid chain stiffness induces protein structural changes and a larger variety of  $\mu$ OR conformations. Hence, POPC interacts more easily with the  $\mu$ OR cavities that are formed during the simulations. It is thus assumed that particular lipid sites exist at the surface of  $\mu$ OR, which promote interactions with POPC due to its tail B flexibility.

All end beads, *i.e.*, C4A/C4B/C5B in POPC and POPE and C4A/C4B in DPPC, are characterized by large numbers of contacts with the  $\mu$ OR AAs, above 7,000, *versus* most of the other lipid beads. Those end beads are located in the middle of the membrane and they interact with apolar AAs in the mid-part of the helices. The helices shift relative to the AAs in the middle, so that they move less and are more available for protein-lipid interactions.

The number of contacts involving the NH3 beads is 5 % smaller than for the CHO beads but again it is not significant considering the error bars (Fig 3C). Contrarily, the difference regarding PO4 beads is significant as the total number of  $\mu$ OR-POPC contacts and  $\mu$ OR-DPPC contacts are 11 % larger than for  $\mu$ OR-POPE; hence differences in interactions appear between PO4 and C2A/C2B. The ethanolamine beads lead to larger conformational changes, such that the first beads of POPE

(PO4 to C2 beads) cannot interact as frequently as in the POPC membrane, the reference lipid. The contact number increases at the level of the last tail beads. The head beads, located at the interface protein/lipid/water, do not modify the interactions at the interface but ethanolamine decreases the number of contacts with the lipid beads comprised between PO4 and C2 compared to choline in POPC. C4 and C5 beads present exactly the same profile of interaction in POPE and in the lipid reference POPC.

In the next part of the paper, we will investigate more specifically each interaction between the lipids and every AA in order to identify more precisely the lipid interaction sites and their dependence on the head type and the acyl chain.

#### 4.4. Interaction profiles between POPC, POPE, and DPPC models and $\mu$ OR

During the MD simulation, the dynamic nature of the lipid-protein interactions is such as lipids interact with the protein only for a limited period of time. To specifically focus on the  $\mu$ OR interaction sites that are accessible to the lipids, we determined the interaction time as a function of the number of contacts between all lipid molecules and the  $\mu$ OR beads. The obtained values were further expressed as percentages *versus* the largest number of contacts observed between each of the AAs and the surrounding lipids (Fig 4). For a clearer reading of the figure, each AA is color-coded according to its interaction frequency with the lipid beads.



from yellow (0 %) to red (100 %).

Firstly, the analysis of the contact numbers of each helix shows that helices H1, H4, and H5 interact more often (more AAs colored in red) with the three types of lipids (Fig 4). Several AAs in these three helices show contacts with all lipid types, *i.e.*, H1 (F84, F87), H4 (F204), and H5 (Y227). Some AAs located in the other helices also frequently interact with all three lipid types, *i.e.*, H2 (F108, F123), H6 (R280, V284), H7 (F320, F338), and H8 (I352). These AAs are mainly located in the membrane with the exception of F204 (H4) and Y227 (H5) that are found at the interface, *i.e.*, the part of the protein in contact with both water and lipid heads.

Among apolar AAs, phenylalanines interact half of the simulation time with the three types of lipids, except F241 (H5) and F289 (H6) that are located in the middle of the helices. F241, in helix H5, is located below F237 and F239, those two interacting frequently with the lipids. Steric hindrance decreases the possibility for the lipid to interact with F241. In H6, F289 is in the hydrophobic core of the protein, with 8 % of  $\mu$ OR-lipid contacts (Fig 4).

Regarding POPC and POPE, which differ at the level of their choline and ethanolamine heads (Figs 4A and 4C), for POPC, we note that contacts between the head beads and  $\mu$ OR occur at the level of H1 (M65, I69, S76, M90, V94), H3 (I138, Y166), H4 (R182, I186), and H5 (L257), while for POPE, contacts are found with H1 (I77, Y91) and H7 (F313). Several AAs of H3 (I138, Y166) and H7 (F313) of  $\mu$ OR interact specifically with POPC and POPE, respectively, as confirmed in the next part of the paper regarding lipid site analysis.

Helices H1 and H4 present two distinct interaction profiles depending on the membrane composition (Figs 4A and 4C). For H1, the most frequent contacts occur with AAs located at different places along the helix as the membrane changes, while for H4, contacts occur with the same AAs but the contact frequencies are larger for POPC than POPE. As already shown before, the contacts with lipids are more frequent for the AAs located in the middle of each helix, *e.g.*, for C190, W192, and I193 in the POPE case (Fig 4C).

Fig 4 also shows that some AAs located at the protein/lipid/water interface act as potent contact sites with the lipid heads. For example, F204 in H4 and Y227 in H5 are characterized by frequent contacts with POPC and POPE. The contact frequency is smaller with POPE (66 and 61 %, respectively) than with POPC (100 and 79 %, respectively). Some AAs interact preferentially with choline in POPC, *i.e.*, M65, I69, S76, M90, V94, I138, I176, R180, and L257 (Fig 4A) or ethanolamine in POPE, *i.e.*, Y91, W133, F135, and F313 (Fig 4C). Thus, choline beads involve more contacts with the smaller AAs (methionine, isoleucine, serine, arginine, valine, and leucine) whereas ethanolamine frequently interacts with aromatic AAs (phenylalanine, tyrosine, and tryptophane) whose steric hindrance is larger. Indeed, choline is a larger bead than ethanolamine in the MARTINI description. As discussed before, the head type does not significantly affect the contact frequency of the CHO and NH3 beads while the head size involves less numerous contacts with beads PO4 to C2 for POPE than for POPC (Fig 3). We will further show that the lipid beads PO4 to C2 in POPE can actually not interact with the nearby AAs due to the ethanolamine bead contacts.

In order to understand the effects of the lipid acyl chain on  $\mu$ OR, we analyzed the contact frequencies occurring with POPC (Fig 4A) and DPPC (Fig 4B), *i.e.*, the two

lipids differing at the level of their chain B, with a C3B bead in DPPC or a D3B bead (representing unsaturation) in POPC (Fig 2).

We first restricted our study to contacts made with the AAs in the middle of the protein. Fig 4 shows that the AAs characterized by the highest contact frequencies occur at different positions at the level of H1 (S76) and H6 (V284) in POPC, and in H1 (I77, V80), H4 (L194), H5 (I234, F237, I238, M243, I247) and H6 (V284) in DPPC. There is thus a different distribution of contacts between  $\mu$ OR and either POPC or DPPC, S76 replaces I77 and V80 in H1, and V284 replaces V291 in H6. DPPC forms more contacts with helices H4 and H5 than POPC (10 % more for H4 and 10 to 30 % more for H5), even if most of the involved AAs are identical. Table 5 showed that the D3B bead in POPC presents more contacts with  $\mu$ OR than C3B in DPPC. With the unsaturated lipid, the membrane is more fluid and the lipid movements are larger. The fluidity of the membrane thus allows to increase the number of contacts with the  $\mu$ OR AAs, while a more rigid membrane constraints the protein, which promotes  $\mu$ OR-lipid contact interfaces.

POPC has one extra bead, C5B, at the end of the acyl chain B (Fig 2). Hence, a POPC membrane is thicker (42 Å) than a DPPC membrane (38 Å). To minimize contacts between apolar AAs and the polar environment,  $\mu$ OR adopts a more compact conformation, which can be characterized in terms of the helix tilt angles. As seen before, the H5 tilt angle is the most affected when the membrane type changes (Table 5). It is corroborated by the analysis of the contacts between the interface AA beads and the lipid beads. As shown in Figs 4A and 4B, the contacts between the lipids and the interface AAs are, for POPC, H1 (I69), H3 (Y166), and H5 (W228), and for DPPC, H1 (Y91, R95), H2 (L129), H5 (V250, L254, R258, K260), and H8 (R348, F350, C351). It is also seen that DPPC interacts more

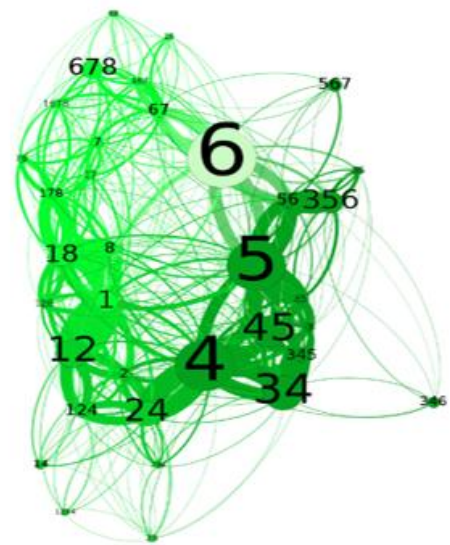
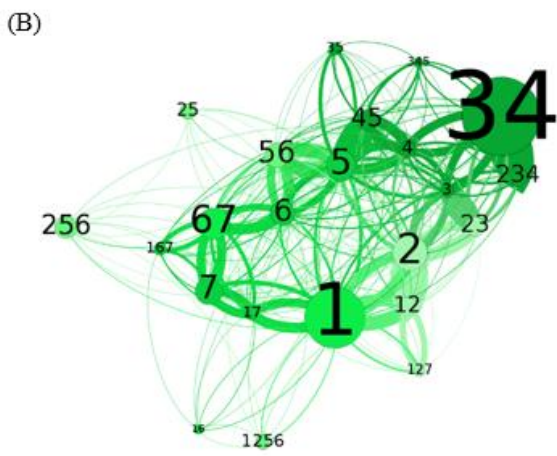
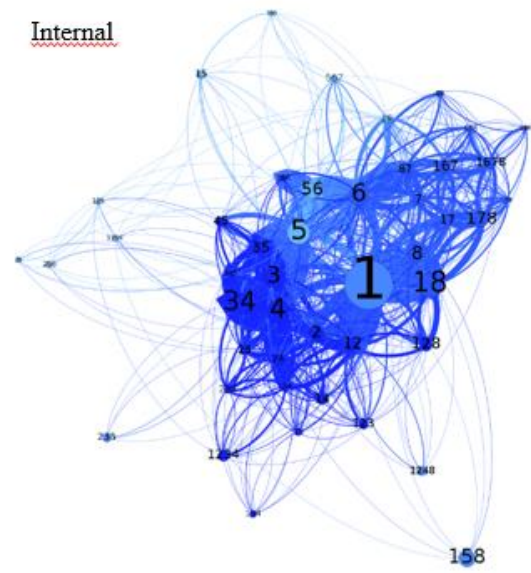
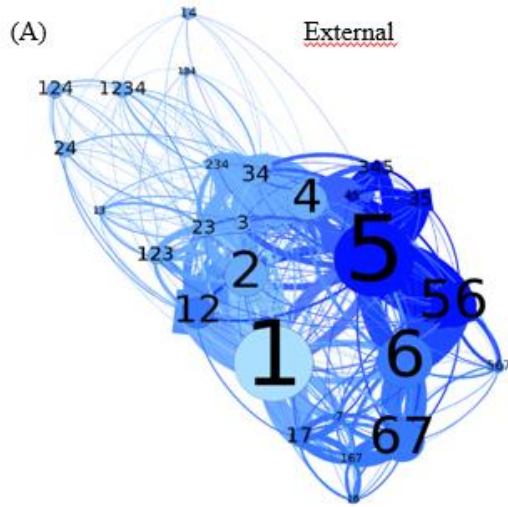


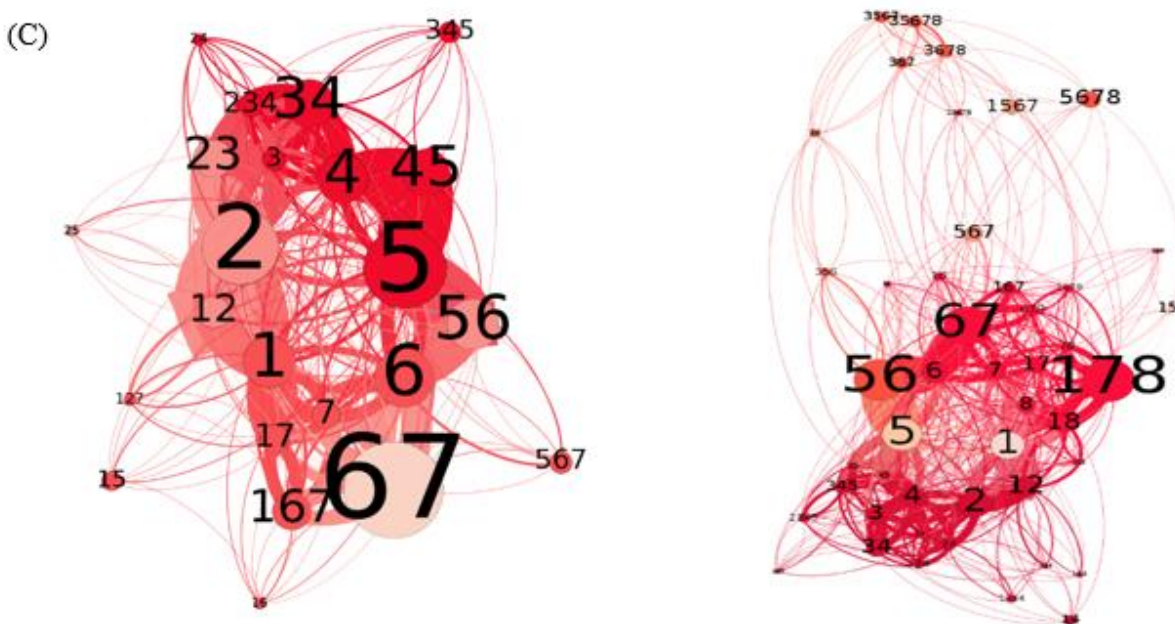
than POPC with the AAs of loop EL1, *i.e.*, W133 and F135. There is an increase of 10 % in the contact frequency of  $\mu$ OR with POPC *versus* DPPC.

The AAs at the protein/lipid/water interface interact thus differently with the three lipids, meaning there are preferred interfaces to enforce interactions between  $\mu$ OR and each lipid. In the following part, we will explore the path of each lipid around the protein to demonstrate how lipids move and block  $\mu$ OR in specific conformations.

#### 4.5. Lipid exchange in their sites at the protein surface

After having identified the AAs interacting with each type of lipid membrane, we studied which protein sites are preferentially visited by the lipid molecules. Indeed, despite the protein rigidity inferred by the MARTINI model, lipids are free to move and exchange their position in the 3D space. In the present section, we focus on the lipid shell surrounding the membrane protein at less than 0.5 nm of distance, both in the internal and in the external layers of the membrane. The preferred contact sites of the lipids and the paths they follow at the protein surface are visualized in Fig 5.





**Fig 5. Network graph of lipid movements around  $\mu$ OR.** Network graph obtained using Gephi as determined from the three 15  $\mu$ s CG MD runs at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K of (A) POPC, (B) DPPC, and (C) POPE interacting with  $\mu$ OR for the external and internal membrane layers. Each circle represents a site of  $\mu$ OR, according to helix label. As an example, 167 stands for helices H1, H6, and H7. The more often a site is visited by lipids, the larger the circle. In the same way, a connection between two nodes is thicker when the lipid transfer frequency between two protein sites is higher. In each network, the node color shade is a function of the clustering results, as described in Materials and Methods.

Fig 5 shows that helices H1 and H6 are privileged sites for all *annulus* lipids. As already mentioned in Part 3.3, there is a larger contact frequency between the lipids and the AAs of helix H1 (Fig 4). As also shown by the Gephi networks, to move from one major site to another, the lipids interact with intermediate sites such as 12, 18, 167, 56, and 67. We detect four clusters for all lipids colored by Gephi clustering as described in Methods, as described below, except for the

internal layer of POPE with five clusters. These clusters allow to emphasize major sites (depicted with large circles) and to gather intermediate sites.

A comparison of the POPC and POPE molecular movements around  $\mu$ OR shows the sites often occupied by lipids, *i.e.*, for POPC membrane, sites 1 and 5 for the outer layer and site 1 for the internal layer (Fig 5A), for POPE, site 67 in the external layer and sites 178, 56, and 67 for the external layer (Fig 5C).

In the particular case of site 1 occurring in the outer layer of POPC (Fig 5A), ethanolamine interacts with H1 and with sites either composed of the helices H2, H6 or H7. The AAs interacting with each lipid are located differently in H1 depending on the lipid nature. More precisely, choline interacts with M65, I69, and S76 (Fig 4A), while ethanolamine interacts with T70 and L74 (Fig 4C). The interactions with ethanolamine beads in H1 are less favorable than choline because POPE interacts more often with site 67 since helices H6 and H7 are close to H1. Regarding H6, ethanolamine beads interact more with L305 than choline but lateral chains of POPC form more contacts with the AAs (Fig 4A). Regarding H7, F313 interacts more often with POPE than POPC and F320 interacts as often with POPC than POPE (Fig 4). One thus concludes that choline preferentially occurs in site 1 while ethanolamine is favorably in contact with  $\mu$ OR at the level of site 67 (Figs 5A and 5C). For both lipids, the lateral chains are linked to site 67.

Regarding site 5 of the external membrane layer, more interactions are detected between  $\mu$ OR and the POPC head beads than with the POPE head beads. They occur at the level of Y227 and W228 (Fig 4A). A reverse trend is observed with the lateral chain beads of both lipid types. Site 5 is an important site for both lipids with privileged contacts for choline and lateral chains of POPE. On the whole,

ethanolamine interacts with site 67, and lateral chains both with sites 5 and 67 (Figs 5A and 5C).

Regarding site 4 of  $\mu$ OR, which is characterized by more contacts with POPC than with POPE, interactions especially occur between F204 of H4 and the lipid head beads. The same contact pattern is seen with helix H3. However, differences appear at site 2, with more contacts for ethanolamine with W133 and F135 of EL1 (Fig 4C). Also, the lateral chains of both lipids form the same number of contacts with the AAs of H2. Choline interacts with H3 and H4 and ethanolamine with EL1. Lateral chains of POPE form contacts preferentially with H2, while POPC presents contacts with H2, H3, and H4 indifferently.

Turning now towards the interactions between  $\mu$ OR and the internal layer of the POPC and POPE membranes, we note that main interaction sites are sites 1 and 178, respectively (Figs 5A and 5C). Regarding H1, both lipids establish contacts with V94 and R95, while choline beads also form contacts with I93 and Y96. These differences induce different patterns for the lateral chains, *i.e.*, M90 and N86 for POPC and Y91 and L88 for POPE (Figs 4A and 4C). Regarding H7, ethanolamine beads make more contacts with F338 than choline. Finally, AAs in H8 present the same interaction profile for POPC and POPE. Choline beads interact preferentially with H1 and ethanolamine with H7, these latter beads inducing a different pattern for the lateral chains in H1 and a conserved pattern for the ones in H8 (Figs 4A and 4C). This explains the main interaction site 1 for POPC and site 178 for POPE (Figs 5A and 5C).

Since ethanolamine interacts with Phe 338 in H7, lateral chains can also make contacts with H6. Site 67, formed by a combination of helices H6 and H7, is thus

the second major site accessible to POPE at the  $\mu$ OR surface (Fig 5C). POPE heads and lateral beads interact with H7 and with helices H7/H8 or H6, respectively. As H5 is strongly tilted (Table 5), compared to the other helices, the lateral chains of the lipids can also interact with H5 and H6, at site 56. Contacts between choline and R258 and L257 in H5 are more frequent along the MD than with ethanolamine (Figs 4A and 4C).

The displacement of lipids from site 67 to site 4 is created by the formation of contacts which appear to be more favorable for POPC, *i.e.*, the choline beads with N183, then the phosphate group with R182 and K184 in H4 and Y166 in H3 (Figs 4A and 4C). The interactions with the lateral chains for helices H2, H3, and H4 are identical for POPC and POPE.

Regarding the comparison between POPC and DPPC located in the external layer of the membrane (Figs 5A and 5B), we note that site 1 is a major interaction site for both lipids, with more interactions between POPC with helix H1 than for DPPC. A close number of contacts is observed with the AAs located at the interface, while it differs for the AAs inside the membrane. Indeed, less numerous contacts between S76 are detected with the unsaturated D3B bead of POPC (Fig 4A). The AAs located in the middle of the membrane, *i.e.*, I77, V80, and L83, create contacts with the terminal beads C4A/B and C5A/B, as already shown in Figs 3A and 3B. Choline beads of POPC and DPPC interacts similarly with  $\mu$ OR.

From site 1, the lipids can move to site 2 (Figs 5A and 5B). It is achieved through an AA anchor, F123, which makes the same number of contacts with both lipids. Regarding the EL1 loop, we note more contacts with W133 and F135 with DPPC than with POPC, as in our comparison of POPC and POPE. Then, the first GL and



C1 beads of the lateral chains interact weakly with AAs of H2, such as M130 and L129 for both POPC and DPPC. On the contrary, POPC form numerous contacts with H3 through I138, L139, K141, and I142, which is not observed for DPPC (Figs 4A and 4B). Site 34 is the main interaction site with the external layer of DPPC (Fig 5B). Yet, interactions with AAs of helix H4 are very weak for DPPC compared to POPC for all the AAs in the membrane, such as P201, L200, L194, I193, and W192. DPPC head bead contacts are partly preserved with F204 at the  $\mu$ OR interface. The contacts are more favorable for the DPPC choline beads with the AAs in EL1, than for POPC choline beads with H4. Lateral chains interact more favorably with H4 and H3 for POPC than for DPPC.

Regarding site 5 (Figs 5A and 5B), the contacts are more favorable with the AAs at the interface, *i.e.*, Y227 and W228, interacting more often with POPC than with DPPC (Figs 4A and 4B), whereas in the middle of the membrane, three AAs, I234, F237, and I238, frequently interact with the lateral chains of DPPC. Regarding H6, we note a different interaction profile for POPC and DPPC. Indeed, for DPPC, contacts are formed with AAs at the interface, like L305, while for POPC, contacts occur with AAs in the membrane, such as Y299, I298, P295, T294, and V291 (Figs 4A and 4B). Finally, for helix H7, two AAs interact equally with both lipids, *i.e.*, F313 and F320. In addition, choline beads of DPPC interact with H6 and POPC with H5, while the lateral chains of DPPC interacts with H5 and POPC with H6 (Figs 4A and 4B).

In the last part of the analysis, we compare the POPC and DPPC behaviors at the level of the internal layer of the membranes (Figs 5A and 5B). Site 1 is the main interacting site for POPC, whereas for DPPC, it has a minor importance. In the more frequently visited sites, it is combined with other helices such as sites 12

and 18. R95, V94, Y91, and F87 in helix H1, interact more often with DPPC than with POPC, while the opposite trend is observed for Y96 and I93. Regarding H2 and H8, the number of contacts is larger for DPPC than it is for POPC. For H2, it involves F108 while for H8, it involves R348, F350, C351, and I352 (Figs 4A and 4B). POPC make more contacts with AAs in helix H1 and less with H2 and H8, privileged by DPPC.

Helix H6 is the major interaction site between  $\mu$ OR and DPPC (Fig 5B). It involves AAs such as, R280, L283, and V284, which interact more often with DPPC than with POPC, as also observed for F338 in helix H7 (Figs 4A and 4B). The next important interacting sites of DPPC are sites 5 and 4, with again more interactions with DPPC than POPC. For helix H4, three AAs frequently interact with DPPC, *i.e.*, I186, C190, and I193. DPPC can also interact with both helices as observed for the intermediate site 45 (Fig 5B). For DPPC, a minor contact site, namely site 35, is also seen in Fig 5B. It is characterized by more numerous contacts between POPC and  $\mu$ OR, especially at the level of Y166 in H3, than with DPPC. A more rigid membrane promotes contacts between  $\mu$ OR and the lipids in the internal leaflet of the membrane.

## 5. Conclusions and discussion

In our work, we performed three 5  $\mu$ s coarse-grained (CG) molecular dynamics (MD) simulations to illustrate the influence of three types of lipid membranes (varying in head type, length, and unsaturation) on the  $\mu$  opioid receptor ( $\mu$ OR) 3D structure. The analyses were based on the tilt angle of the  $\mu$ OR helices, on a frequency analysis of the contacts between the  $\mu$ OR amino acids (AAs) and lipid beads, and on a network analysis through Gephi. To our knowledge, the last part



is a very original method to study lipid-protein interactions and follow the particular lipid paths around the protein with a network graph.

Our CG model was validated *versus* AA simulation, by comparing the main parameters such as the RMSD, the tilt angle of the helices and the properties of the membrane, of which we mention here only the area by lipid. Let us note that other methods, like ELNEDYN [40] and GoMartini [41], based on elastic networks have been proven as good tools to increase the elasticity of CG models.

On one hand, it is shown that the choline head (CHO) of POPC and ethanolamine head (NH3) in POPE do not significantly change the  $\mu$ OR-lipid interactions with the AAs at the protein/lipid/water interface. Rather, the number of contacts occurring between  $\mu$ OR and the beads of the lipid chains, from PO4 to C2 is lower, due to the steric hindrance of the lipid head. The choline CHO bead is larger than the ethanolamine NH3 bead and interacts preferentially with the smaller AAs, such as methionine, isoleucine, serine, arginine, valine or leucine. At the opposite, NH3 interacts preferentially with aromatic AAs like phenylalanine, tyrosine, and tryptophan (Fig 4). Interactions with the AAs of these aromatic AAs are either impossible with the acyl chain beads in POPE or differ considerably.

Additionally, as the helices pivot around their central AAs and the interactions with the central AAs are retained, the end beads, C4 and C5, interact identically for POPC and POPE. The modifications of the interaction types between  $\mu$ OR and the acyl beads, from PO4 to C2, induce the blocking of the protein in a limited number of specific conformations. For example, ethanolamine interacts differently with helix H1 or  $\mu$ OR than choline does. The number of contacts made with the AAs at the water/lipid/protein interface is decreased while the number

of contacts between the terminal C4 and C5 lipid beads and the middle of the membrane is increased (Fig 3).

Moreover, the tilt angle of helix H5 is larger for the POPC membrane than for DPPC (Table 5) because the membrane is thicker whereas for the DPPC membrane, due to saturation, it is more compact. Within the inner layer of the membrane, DPPC makes more contacts with the  $\mu$ OR receptor than POPC. The inner part of the protein is less flexible and it helps a rigid lipid like DPPC to interact more frequently. The outer part, where the ligand pocket is located, is more mobile and more sensitive to environmental changes that modulate the receptor part of the protein.

Our results confirm the modulation of  $\mu$ OR conformations by lipids and show precisely the preferable locations of the AAs which interact with each of the lipid types. As we used three different lipids, the various interactions block  $\mu$ OR in different shapes illustrating the need of MD simulations of proteins in complex membranes with more than one lipid. Similar adaptations of GPCRs by the lipids have already been observed both experimentally [42] and theoretically [43, 44].

The main sites for oligomerization are H1/H2/H8 and H5/H6 as determined by MD [45] and X-ray crystallography [2] for  $\mu$ OR as well as a lot of GPCRs [46, 47]. Knowing that these helices are also involved in weak interactions with lipids and that lipids can promote GPCRs dimerization [48-50], the question of knowing how the lipid sites determined within our work are available for dimerization can be raised.

To conclude on the protein conformations mediated by the lipid types, we have shown that the lipid heads modify the conformations of the proteins through a small number of interactions. They act as a guide for the acyl chain at the protein surface with a preference for unsaturated chains as in POPC and POPE. Finally, the observed modifications open the way to new horizons in the study of the ligand binding pocket as lipids change the conformations of the entire protein and not only the protein surface. Let us add that a direct link between protein-lipid interactions and protein function has been recently published [51], which would be interesting to see confirmed by experimental studies. From all those recent works, we can affirm the need of various lipid membranes together for the study of the protein  $\mu$  with MD methods to characterize the diversity of protein conformations.

### **Acknowledgements**

MAA thanks the Belgian National Fund for Research (F.N.R.S.) for her F.R.I.A. doctoral fellowship. The research used resources of the “Plateforme Technologique de Calcul Intensif (PTCI)” (<https://www.ptci.unamur.be>) located at the University of Namur, Belgium, which is supported by the FNRS-FRFC, the Walloon Region, and the University of Namur (Conventions No 2.4520.11, GEQ U.G006.15, 1610468, and RW/GEQ2016). The PTCI is member of the “Consortium des Equipements de Calculs Intensifs (CECI)” (<http://www.ceci-hpc.be/>). All authors thank Prof A. Laaksonen (Stockholm University) for fruitful discussions.

### **References**

1. Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, et al.

- Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*. 2012; 485: 400-404.
2. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, et al. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. 2012; 485: 321-327.
  3. Wu H, Wacker D, Katritch V, Mileni M, Won Han G, Vardy E, et al. Structure of the human  $\kappa$ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*. 2012; 485: 327-332.
  4. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Diversity and modularity of G-protein coupled receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci*. 2012; 33: 17-27.
  5. Trang T, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gustein H, Cahill CM. Pain and poppies: the good, the bad, and the ugly of opioid analgesics. *J. Neurosci*. 2015; 35: 13879-13888.
  6. Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1612: 1-40.
  7. Palsdottir H, Hunte C. Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1666: 2-18.
  8. Lee AG. Lipid-protein interactions. *Biochem. Soc. Trans*. 2011; 39: 761-766.
  9. Laganowsky A, Reading E, Allison TM, Ulmschneider MB, Degiacomi MT, Baldwin AJ, et al. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*. 2014; 510: 172-180.
  10. Van Meer G, de Kroon AIPM. Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci*. 2011; 124: 5-8.
  11. Chattopadhyay A. GPCRs: lipid-dependent membrane receptors that act as drug targets. *Adv. Biol*. 2014; 143023.
  12. Huster D. Solid-state NMR spectroscopy to study protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1841: 1146-1160.

13. Zheng H, Pearsall EA, Hurst DP, Zhang Y, Chu J, Zhou Y, et al. Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize  $\mu$ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biology*. 2012; 13:6.
14. Kobilka B, Schertler GFX. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol. Sci*. 2008; 29: 79-83.
15. Chavent M, Duncan AL, Sansom MSP. Molecular dynamics simulations of membrane proteins and their interactions: from nanoscale to mesoscale. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2016; 40: 8-16.
16. Miao Y, McCammon JA. G-protein coupled receptors: advances in simulation and drug discovery. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2016; 41: 83-89.
17. Grossfield A, Feller SE, Pitman MC. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids. *PNAS*. 2006; 103: 4888-4893.
18. Horn J, Kao T-C, Grossfield A. Coarse-grained molecular dynamics provides insight into the interactions of lipids and cholesterol with rhodopsin. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2014; 796: 75-94.
19. Grossfield A. Recent progress in the study of G protein-coupled receptors with molecular dynamics computer simulations. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1808: 1868-1878.
20. Johnston JM, Filizola M. Showcasing modern molecular dynamics simulations of membrane proteins through G protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2011; 21: 552-558.
21. Neale C, Herce HD, Pomès R, García AE. Can specific protein-lipid interactions stabilize an active state of the beta 2 adrenergic receptor? *Biophys. J*. 2015; 109: 1652-1662.
22. Shang Y, Filizola M. Opioid receptors: structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *Eur. J. Pharmacol*. 2015; 763: 206-213.

23. Botelho AV, Huber T, Sakmar TP, Brown MF. Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophysical J.* 2006; 91: 4464-4477.
24. Sengupta D, Chattopadhyay A. Identification of cholesterol binding sites in the serotonin 1A receptor. *J. Phys. Chem.* 2012; 116: 12991-12996.
25. Periole X, Knepp AM, Sakmar TP, Marrink SJ, Huber T. Structural determinants of the supramolecular organization of G protein-coupled receptors in bilayers. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134: 10959-10965.
26. Marino KA, Prada-Garcia D, Provasi D, Filizola M. Impact of lipid composition and receptor conformation on the spatio-temporal organization of  $\mu$ -opioid receptors in a multi-component plasma membrane model *PLoS Comput. Biol.* 2016; 12: e1005240.
27. Fossépré M, Leherte L, Laaksonen A, Vercauteren DP. On the modularity of the intrinsic flexibility of the  $\mu$  opioid receptor: a computational study. *PLoS ONE.* 2014; 9:e115856.
28. MacKerell AD Jr, Feig M, Brooks CL III. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* 2004; 25: 1400-1415.
29. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 2009; 29: 1859-1865.
30. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996; 14: 33-38.
31. Marrink SJ, de Vries AH, Mark AE. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B.* 2004; 108: 750-760.
32. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse-grained model for biomolecular simulations. *J. Phys.*

- Chem. B. 2007; 111: 7812-7824.
33. Monticelli L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ. The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 2008; 4 :819-834.
34. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005; 26: 1781-1802.
35. Glykos NM. Carma: a molecular dynamics analysis program. *J. Comput. Chem.* 2006; 27: 1765-1768.
36. Dahl ACE, Chavent M, Sansom MSP. Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics.* 2012; 16: 2193-2194.
37. De Jong DH, Periole X, Marrink SJ. Dimerization of amino acid side chains: lessons from the comparison of different force fields. *J. Chem. Theory Comput.* 2012; 8: 1003-1014.
38. Bastian M, Heymann S, Jacomy M. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. *International AAAI Conference on weblogs and social media.* 2009.
39. Blondel VD, Guillaume B-LJ, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *J Stat Mech Theory Exp.* 2008: P10008.
40. Périole X, Cavalli M, Marrink SJ, Ceruso MA. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: structure, dynamics, and intermolecular recognition. *J. Theory Comput.* 2009; 5: 2531-2543.
41. Poma AB, Cieplak M, Theodorakis PE. Combining the MARTINI and structure-based coarse-grained approaches for the molecular dynamics studies of conformational transitions in proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 2017; 13: 1366-1374.
42. Yeagle PL. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins.

- Biochim. Biophys. Acta. 2014; 1838: 1548-1559.
- 43.Sadiq SK, Guixà-González R, Dainese E, Pastor M, De Fabritiis G, Selent J. Molecular modeling and simulation of membrane lipid-mediated effects on GPCRs. *Curr. Med. Chem.* 2013; 20: 22-38.
- 44.Periole X. Interplay of G protein-coupled receptors with the membrane: insight from supra-atomic coarse grain molecular dynamics simulations. *Chem. Rev.* 2017; 117: 156-185.
- 45.Provasi D, Boz MB, Johnston JM, Filizola M. Preferred supramolecular organization and dimer interface of opioid receptors from simulated self-association. *PLoS Comput. Biol.* 2015; 11: e10044148.
- 46.Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. Molecular dynamics simulations and structure-based network analysis reveal structural and functional aspects of G-protein coupled receptor dimer interactions. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2016; 30: 489-512.
- 47.Farran B. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Pharmacol. Res.* 2017; 117: 303-327.
- 48.Prasanna X, Chattopadhyay A, Sengupta D. Cholesterol modulates the dimer interface of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor via cholesterol occupancy sites. *Biophys. J.* 2014; 106: 1290-1300.
- 49.Marino KA, Prada Gracia D, Provasi D, Filizola M. Impact of lipid composition and receptor conformation on the spatio temporal organization of  $\mu$  opioid receptors in a multi-component plasma membrane model. *PLoS Comput. Biol.* 2016; 12:e1005240.
- 50.Prasanna X, Sengupta D, Chattopadhyay A. Cholesterol dependant conformational plasticity in GPCR dimers. *Sci. Rep.* 2016:31858.
- 51.Zeppelin T, Ladefoged LK, Sinning S, Périole X, Schiott B, A direct interaction of cholesterol with the dopamine transporter prevents its out-to-inward



transition. PLoS Comput. Biol. 2018; 14: e1005907.

## Supporting Information

**S1 Table. Number of atoms (AA systems) or residues (CG systems) for  $\mu$ OR embedded in each membrane types.**

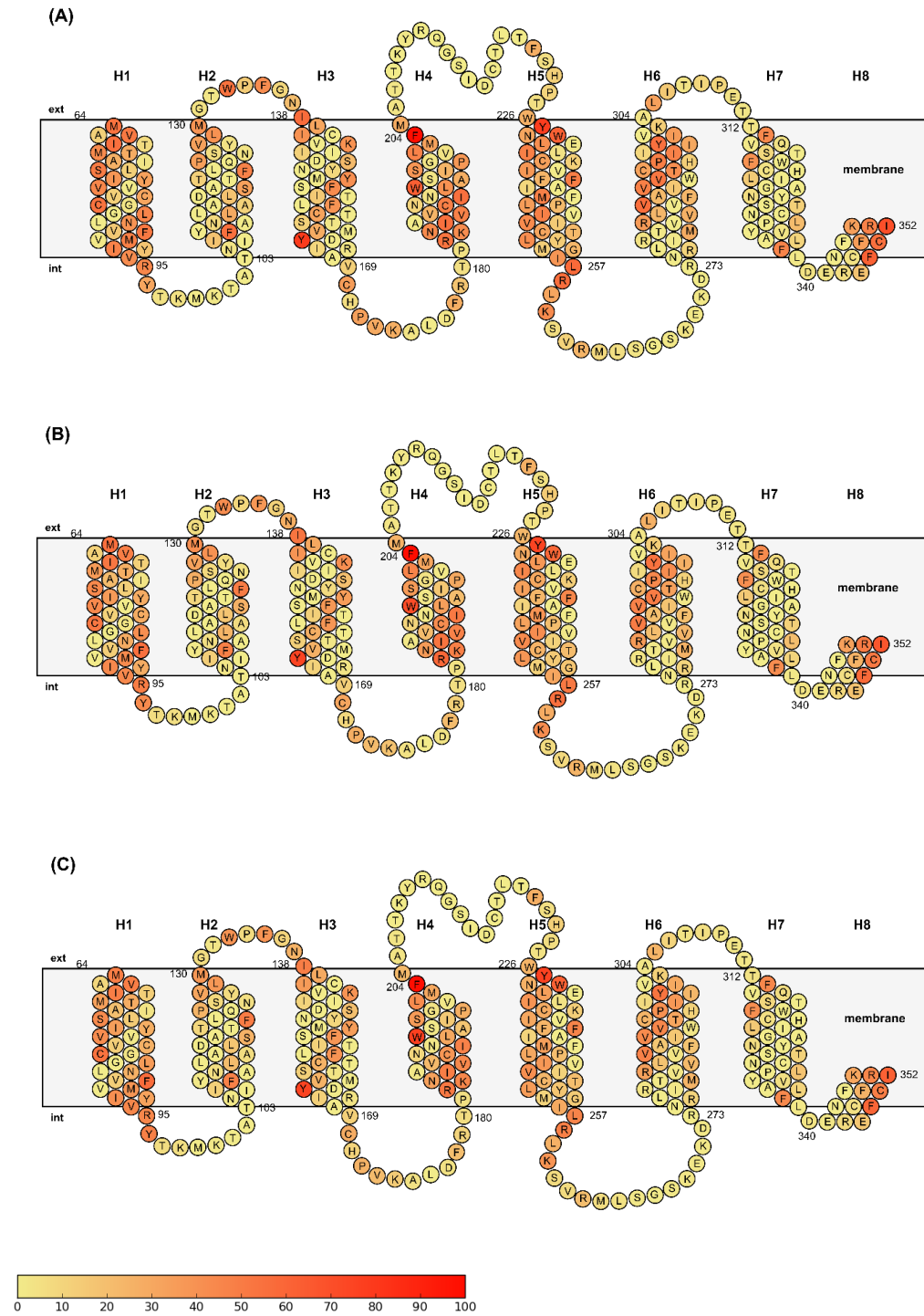
Method	POPC		DPPC	POPE
	AA	CG	CG	CG
$\mu$ OR	4,728	669	669	669
Lipids	74,236	7,201	6,563	7,120
Water	164,701	11,573	11,365	10,835
Cl <sup>-</sup>	484	12	12	12

**S2 Table. Protocol of the all-atom MD simulations.** NVT (constant Number, Volume, and Temperature) and NPT (constant Number, Pressure, and Temperature).

	Integration step (fs)	Time	Ensemble
Minimization	3,000 steps		
Equilibration	2	2.7 ns	NVT
Production	2	80 ns	NPT

**S1 Fig. Primary structure of  $\mu$ OR in the POPC membrane with contacts between protein and lipid beads at a range of (A) 0.5 nm, (B) 0.6 nm, and (C) 0.7 nm. Each AA of  $\mu$ OR is colored as a function of its contact frequency with the lipids, as**

obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K, ranging from yellow (0 %) to red (100 %).





**Références** : soumis en 2019

**Contribution**

Marie-Ange Angladon : conception, calculs, analyses, visualisation et écriture

Laurence Leherte : révision et édition

Daniel P. Vercauteren : révision, édition et supervision

Chapitre 2 : Cholesterol sites at the surface of the  $\mu$  opioid receptor: a  
coarse-grained molecular dynamics study

Les pages 131 à 165 correspondent à la dernière version telle qu'elle sera  
soumise.



## **Cholesterol sites at the surface of the $\mu$ opioid receptor: a coarse-grained molecular dynamics study**

Marie-Ange Angladon\*, Laurence Leherte, Daniel P. Vercauteren

Laboratoire de Physico-Chimie Informatique, Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale, Namur Medicine and Drug Innovation Center (NAMEDIC), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

\* Corresponding author

E-mail: marie-ange.angladon@unamur.be

**Keywords:** GPCR;  $\mu$  opioid receptor; cholesterol; phospholipids; molecular dynamics; coarse-grain.

**Abbreviations:** 3D (three-dimensional), AA (amino acid), CCh (POPC + 30 % of cholesterol), CG (coarse-grained), CARC (Cholesterol Amino acid Recognition/interaction Consensus sequence), CCM (Cholesterol Consensus Motif), Chol (cholesterol), CRAC (Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence), DCh (DPPC + 30 % of cholesterol), DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), ECh (POPE + 30 % of cholesterol), EL (extracellular loop), Ext (external), FF (force field), GPCR (G-protein coupled receptor), Hi (helix i), IL (intracellular loop), Int (internal), MD (molecular dynamics), OR (opioid receptor), PDB (Protein Data Bank), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), TM (transmembrane).

## 1. Abstract

The treatment of pain has always been a major concern of society. Although numerous drugs, notably among the opioid analgesics, have been extensively used to treat pain for centuries, the associated mechanism at the molecular level in a physiological realistic environment is still not totally understood. Through our computational work, *i.e.*, coarse-grained molecular dynamics, we concentrated on the  $\mu$  opioid receptor ( $\mu$ OR), the most involved in pain, in a lipid environment. In particular, we chose to focus on the influence on the  $\mu$ OR structure of different types of membranes composed of three lipids (varying in head type, length, and saturation) with 30% of cholesterol. We precisely show how  $\mu$ OR-lipid interactions influence the major  $\mu$ OR orientations according to the membrane type.

## 2. Introduction

Several experimental approaches have already shown the lipid influence on the structure, the function, and the folding of membrane proteins [1, 2]. Lipids can bind specific sites at the membrane protein surface such as for G-protein coupled receptors (GPCRs) [3]. Moreover, protein-lipid interactions are ligand-like as rhodopsin modulated by phosphatidylethanolamine [4-6]. Typical GPCR structures consist of seven transmembrane  $\alpha$ -helices (H1 to H7) and a short intracellular helix (H8), separated by three extracellular loops (EL1-EL3), and three intracellular loops (IL1-IL3). The N- and C-terminal domains are in the extra- and the intracellular side, respectively.

Biochemical experiments also demonstrated the role of cholesterol on the GPCRs [7, 8]. Among GPCRs, opioid receptors (ORs) are divided in three subtypes:  $\mu$ ,  $\delta$ , and  $\kappa$ . Regarding the pain treatment with morphine and opiate alkaloid, the  $\mu$

opioid receptor ( $\mu$ OR) is the most important protein within the opioid receptor family.

In 2000, Lagane and its collaborators particularly demonstrated the influence of cholesterol on the  $\mu$ OR function [9]. In 2006, the  $\kappa$ OR was localized in microdomains, such localization affecting G-protein couplings [10]. A year after, the  $\delta$ OR was also recognized to be part of the time in the microdomains and the decrease in cholesterol concentration proved, for the first time, its role for G-proteins [11]. More recently, the discovery of the crystallographic structure of  $\mu$ OR highlighted protein-lipid interactions as a cholesterol was found between helices H6 and H7 of the receptor in both inactive [12, 13] and active state [14].

Among all the lipid types, cholesterol has a unique place in the plasmic membrane. Without aliphatic chains, it is described by a polycyclic structure and a small polar head group. Due to its geometry, cholesterol can be perpendicular or parallel to the membrane phospholipids. Theoretical predictions localized cholesterol sites at the protein surface. Linear sites were defined as CRAC (Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence) and CARC (Cholesterol Amino acid Recognition/interaction Consensus sequence) sites, *i.e.*, (L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)- X<sub>1-5</sub>-(K, R), X standing for undefined residues for CRAC and (K/R)-X<sub>1-5</sub>-(Y/F)- X<sub>1-5</sub>-(L,V) for CARC sequences [15]. Another three-dimensional (3D) sequence was illustrated by the cholesterol-consensus motif (CCM) which is composed of basic (K, R), aromatic (F, Y, W), and aliphatic (I, V, L) residues. The CCM site is divided on two helices, H2 and H4 and forms a 3D structure [16]. A cartoon of the cholesterol predicted sites at the  $\mu$ OR surface is presented in Fig 1.

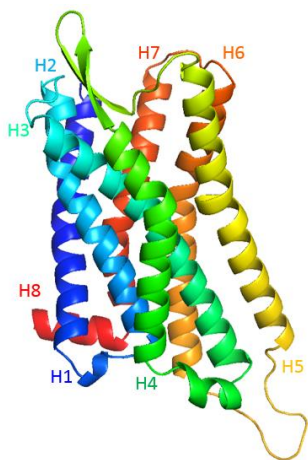




### 3. Materials and methods

#### 3.1. Molecular systems

The complete all-atom structure of  $\mu$ OR, already described in [17], was obtained from the X-ray diffraction structure [12] available in the Protein Data Bank (ID: 4DKL) and further modelled with the CHARMM27 force field (FF) [18]. The protein is composed of 7 transmembrane helices (H1 to H8) and an intracellular helix 8 (Fig 2). H3 is located between H2 and H4 in the extracellular and between H4 and H5 in the intracellular part. H5 is divided into two parts by P244 which induces a torsion angle.



**Fig 2. Cartoon representation of the  $\mu$ OR 3D structure.** Notations of the 7 transmembrane helices (H1 to H7) and the intracellular helix H8.

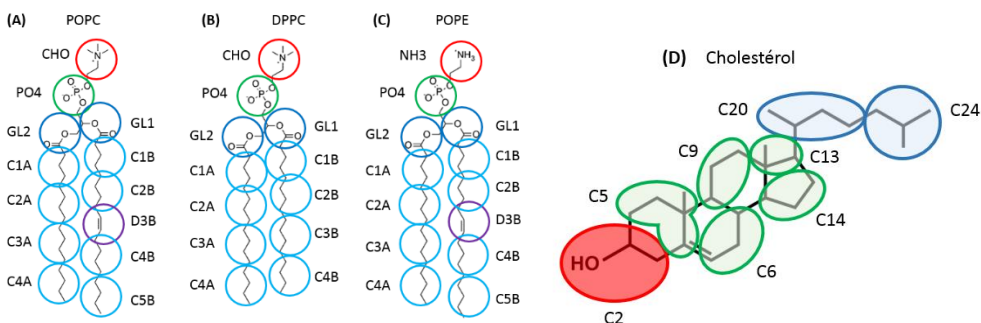
To set up the supramolecular protein-lipid system, three membrane models, constituted of POPC, DPPC, or POPE molecules, interacting through the CHARMM36 FF [19], were generated with the Charmm Builder tool [20]. The  $\mu$ OR receptor was then embedded in each membrane composed of 600 lipids with 30 % of cholesterol, solvated with water (2.5 Å above and below the membrane) and

neutralizing counterions (12 Cl<sup>-</sup>), using VMD scripts [21] for a simulating box of 200 x 200 x 90 Å. The number of beads for each considered system is presented in Table 1.

**Table 1. Number of beads for  $\mu$ OR embedded in each membrane type.**

	<b>CCh</b>	<b>DCh</b>	<b>ECh</b>
<b><math>\mu</math>OR</b>	669	669	669
<b>Phospholipid</b>	4,678	4,366	4,665
<b>Cholesterol</b>	1,502	1,446	1,478
<b>Water</b>	10,524	9,909	9,418
<b>Cl<sup>-</sup></b>	12	12	12

The so-obtained all-atom systems were then transformed into MARTINI v.2.1 coarse-grained (CG) representations, using VMD [22-24]. In the framework of the MARTINI FF, four basic interaction sites are considered: polar (P), nonpolar (N), apolar (C), and charged (Q) [24]. POPC is modelled with a 13-beads model with two Q beads representing the zwitterionic head groups, two N beads for the ester groups, and four to five C beads for the two fatty acyl chains (Fig 3A). DPPC differs from POPC by one C bead in one of the two acyl chains (Fig 3B); the head group of POPE differs from POPC as it includes an ethanolamine bead (Fig 3C). DPPC and POPC have similar heads but different tails; in POPC, the D3B beads correspond to an unsaturation in tail B (Fig 3A), whereas in DPPC, both saturated tails involve a C3 bead (Fig 3B). DPPC is a smaller lipid than POPC and POPE with no C5B bead. The cholesterol molecule is composed of 8 beads, with one polar bead (C2), 5 apolar beads to represent the aromatic cycles, and 2 apolar beads for the aliphatic chain (Fig 3D). The results obtained from all-atom and CG system for POPC systems were compared and found to be similar [25].



**Fig 3. Superimposition of the heavy atoms and MARTINI beads of the different lipids. (A) POPC, (B) DPPC, (C) POPE, (D) Cholesterol.**

### 3.2. Molecular Dynamics simulations

The CG MD simulations were performed with the NAMD 2.8 package [26]. To remove initial unfavorable contacts, the total potential energy of each system was first minimized using a conjugate gradient approach with a maximal number of 1,000 steps (Table 2). Then, a series of equilibration steps using Langevin dynamics was performed to further remove contacts that led to high energy values, first during 20 ns with a time step of 10 fs in NVT conditions, and then during 3 x 10 ns with a progressively increased time step value, *i.e.*, 10, 20, and 30 fs, in NPT conditions. The equilibration was needed to melt the lipid tails and let the lipids rearrange correctly in the membrane and around  $\mu$ OR. Finally, the  $\mu$ OR-CCh,  $\mu$ OR-DCh, and  $\mu$ OR-ECh systems were run for 5  $\mu$ s at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K. From each MD simulation, only one frame out of  $10^6$  iterations was saved, due to the reduced flexibility of the MARTINI models and the low mobility of the molecules. Each production run was repeated three times and results were averaged for statistical purpose. Let us remark that CG MD simulations of  $\mu$ OR embedded in pure POPC, POPE, and DPPC membranes were validated by comparisons with all-atoms simulations performed in the same protocol conditions [25].

**Table 2. Protocol of the CG MD simulations.** NVT (constant Number, Volume, and Temperature) and NPT (constant Number, Pressure, and Temperature).

	Integration step (fs)	Time	Ensemble
<b>Minimization</b>	1,000 steps		
<b>Equilibration</b>	10	20 ns	NVT
	10	10 ns	NPT
	20	10 ns	
	30	10 ns	
<b>Production</b>	30	5 $\mu$ s	

### 3.3. Analysis methods

MD results were analyzed after alignment of all saved system frames on the  $\mu$ OR structure with the program Carma [27]. Due to the known rather rigid MARTINI model, we consider that  $\mu$ OR conformations are sufficiently stable to allow path calculations from MD frames saved every  $10^6$  iterations.

The Bendix plugin [28], part of VMD, was considered to evaluate the maximum tilt angle of the receptor helices. This plugin uses a sliding window of four residues, along the predefined helix, to lead to local helix axes that are joined by a spline. It allows to study helix torsions more realistically. The helices globally rotate around the amino acids (AAs) located in their middle.

In-house Python3 scripts were written to measure the distance between beads of the protein and beads of the lipids. We determined the contact frequency between each AA and each surrounding lipid, each AA being colored by its contact frequency with lipids on the primary structure representation. Sengupta *et al.*, established contacts between protein and lipids when the distance is less than 0.6 nm [29]. de Jong *et al.*, who also studied protein-lipid interactions using the

MARTINI model, considered a contact between two beads, with a distance criteria of 0.5 nm [25, 30].

Finally, we used Gephi [31] to analyze the lipid sites at the  $\mu$ OR surface. Gephi is a graph visualization software that allows to display results in terms of graphs or networks. We considered the default parameters of Gephi and defined the input parameters as follows. For each lipid that interacts with  $\mu$ OR at least 20 % of the MD simulation time, helices located at a distance shorter than 0.5 nm were searched, for each MD frame. Each protein contact was then defined by each helix number. Identical successive helix numbers were deleted to visualize the lipid movements from one visited site to another. The data associated to each of the lipids were utilized to generate networks, as a function of the membrane composition, in order to determine the protein sites visited by the lipids and the paths they follow, represented by the nodes and connections. Both node and path size values are proportional to their browse frequency. Lipid movements in the internal and in the external leaflets of the membrane were separated. Gephi also allows to depict each output network in terms of clusters, as described in the Louvain methods with a modularity coefficient of 0.8 [32].

## 4. Results

### 4.1. Tilt angle of the $\mu$ OR helices

The protein conformations may be characterized by the tilt angle of their helices (**Table 3**). A detailed analysis of the tilt angle values obtained for each  $\mu$ OR helices in each membrane type shows that protein and lipids adapt one to each other by minimizing their polar contacts.

**Table 3. Maximum tilt angles, with standard deviations, of each helix of  $\mu$ OR.**

They are calculated using the Bendix plugin of VMD for CCh, DCh, and ECh systems, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K. POPC-Chol stands for the  $\mu$ OR-POPC system, and POPC+Chol for the  $\mu$ OR-CCh system.

Helix	POPC (°)		DPPC (°)		POPE (°)	
	- Chol	+ Chol	- Chol	+ Chol	- Chol	+ Chol
H1	17.1 $\pm$ 1.7	18.4 $\pm$ 0.2	18.7 $\pm$ 0.7	17.6 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 0.8	18.9 $\pm$ 0.7
H2	14.2 $\pm$ 1.0	15.6 $\pm$ 1.5	15.0 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.9	13.8 $\pm$ 1.6
H3	15.2 $\pm$ 0.8	15.8 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.9	15.7 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.9
H4	19.5 $\pm$ 0.8	17.7 $\pm$ 0.9	18.4 $\pm$ 2.2	18.7 $\pm$ 1.3	16.6 $\pm$ 0.4	19.1 $\pm$ 1.4
H5	55.7 $\pm$ 7.1	53.1 $\pm$ 7.5	63.7 $\pm$ 5.0	65.6 $\pm$ 1.5	49.8 $\pm$ 9.5	51.3 $\pm$ 6.3
H6	17.1 $\pm$ 1.6	18.0 $\pm$ 1.5	19.6 $\pm$ 0.8	18.7 $\pm$ 0.2	19.3 $\pm$ 0.8	19.0 $\pm$ 1.5
H7	15.2 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 0.9	14.7 $\pm$ 1.3	14 $\pm$ 1.0
H8	9.8 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 0.2	9.8 $\pm$ 0.5	11.3 $\pm$ 0.2

The addition of cholesterol does not greatly modify the tilt angle values of the helices, as the largest difference is 2.5° for H4 between ECh and the pure POPE membrane (Table 3).

While the tilt angle of H4 increases, it decreases for H1, H2, and H6. Similarly, the deformations for H1, H2, H4 and H6 are inverted between POPC and DPPC/POPE. There are three intracellular sites for cholesterol in H1 and H2 (CRAC1, CRAC2, and CRAC3) and one extracellular site in H4 (CARC1), as mentioned in the Introduction. It suggests that cholesterol preferentially interacts with intra- or extracellular cholesterol sites at the  $\mu$ OR surface which induces helix tilt variations

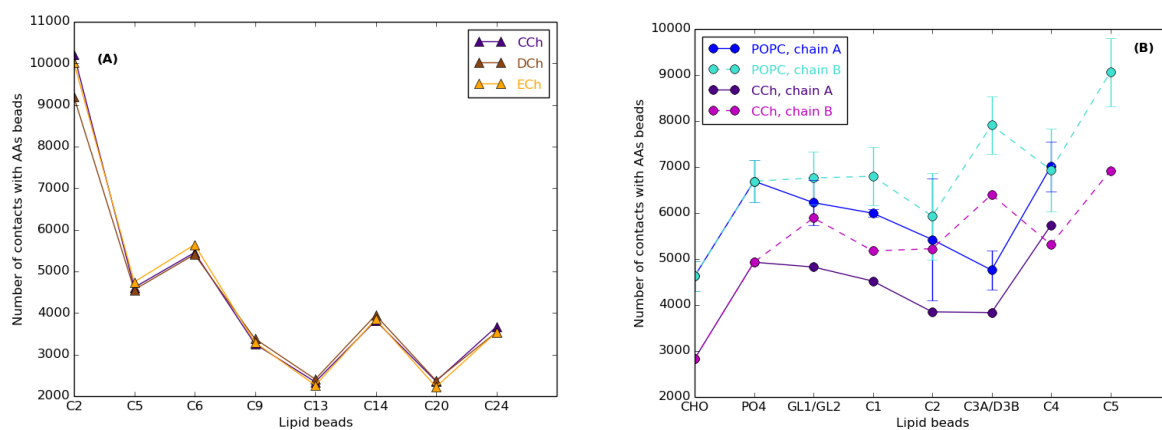
according to the nature of the phospholipid environment.

Regarding helix H5, there are two sites for cholesterol, one in extracellular membrane leaflet (CARC2) and one other in intracellular membrane leaflet (CRAC4). There is no significant variation of tilt angle for H5 in CCh; it increases for ECh (from 50 to 65°) and decreases for DCh (from 65 to 52°) (Table 3). Considering the previous hypothesis, we suggest that lipids in CCh interact similarly with helix H5. For ECh, one of the two cholesterol sites is privileged by the lipids. It is at the origin of the increased tilt angle values of the helices. The opposite behaviour is observed for the DCh membrane.

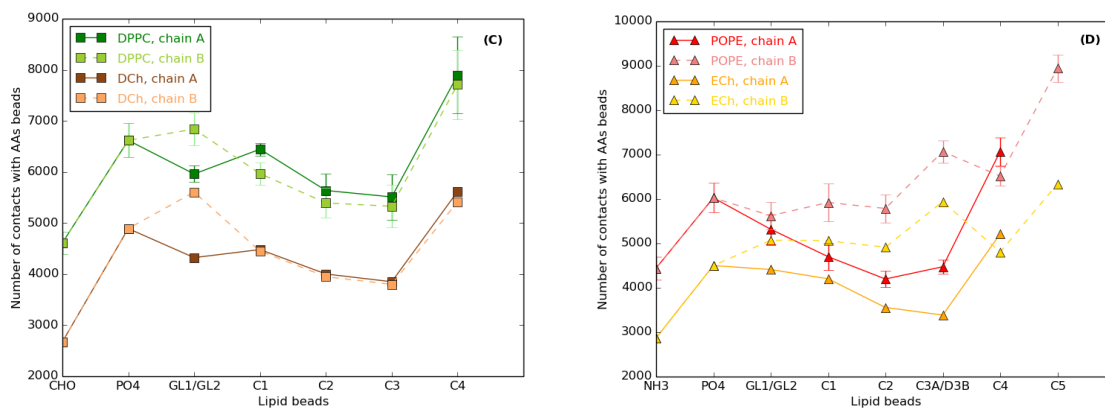
Finally, for helices H3 and H7, the tilt angles similarly vary for CCh and DCh compared to ECh. These helices are buried in the protein and less subject to lipid contacts.

## 4.2. Protein-lipid interactions

Cholesterol affects protein-lipid interactions by stiffening both the protein and the membrane. Contacts between each  $\mu$ OR bead and each lipid bead were determined to differentiate the  $\mu$ OR-phospholipid and  $\mu$ OR-cholesterol interactions (Fig 4).







**Fig 4. Number of contacts between the protein and lipid beads. (A)** POPC and CCh. **(B)** DPPC and DCh. **(C)** POPE and ECh. **(D)** Cholesterol, obtained from the 15  $\mu$ s CG MD simulations at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K. The D3B bead in POPC and POPE is replaced by a C3B in DPPC. Points are connected to facilitate the reading of the graphs.

Cholesterol interacts similarly with  $\mu$ OR independently of the phospholipids in the membrane (Fig 4A). First, for  $\mu$ OR-cholesterol interactions, the number of contacts with the head bead C2 is twice as large as with the other beads. Choline or ethanolamine interact two times less with  $\mu$ OR than C2 of cholesterol (Figs 4B-D). We remark that several beads among the cholesterol ring, C6 and C14, interact more often than C9 and C13, illustrating the soft and rough face of the lipid (Fig 4A). There are more contacts with C24 than with C20 in the lateral chain, due to the larger mobility of the beads which promotes contacts with the  $\mu$ OR receptor.

Comparing the phospholipid molecules in the pure and in mixed membranes to identify the effect of cholesterol on the  $\mu$ OR-phospholipid interactions (Figs 4B-D), one sees that the contact profiles present the same trend, with and without

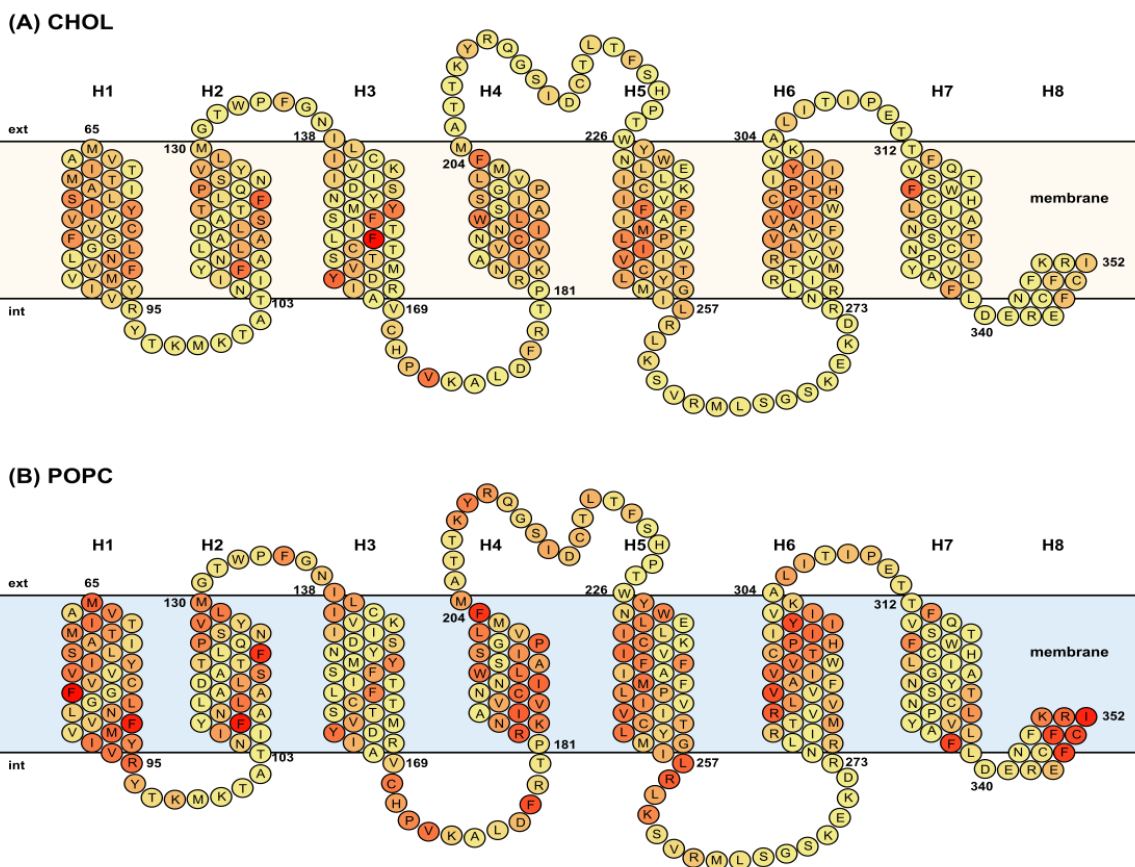
cholesterol. However, the amount of contacts is reduced by about 2,000 when cholesterol is included in the membranes. Particularly, cholesterol molecules rigidify the membranes, which blocks the protein structure in fewer conformations and promotes long-lasting protein-lipid interactions.

In the next part, cholesterol interaction sites of the protein will be identified as a function of the membrane type,.

#### 4.3. Contact map of cholesterol and phospholipids

The dynamic nature of the protein-lipid interactions is such as lipids interact with the protein only for a limited period of time during the MD simulation. To specifically focus on the  $\mu$ OR interaction sites that are accessible to the lipids, we determined the contact time as a function of the number of contacts between all lipid molecules and the  $\mu$ OR beads. The obtained values were further expressed as percentages *versus* the largest number of contacts observed between each of the AAs and the surrounding lipids (Figs 5-7). For a clearer reading of the figures, each AA is color-coded according to its contact frequency with the lipid beads.

To identify hot spots for cholesterol and for lipids at the  $\mu$ OR surface, protein-lipid contact maps were established with a distance cut-off value of 5 Å. First, cholesterol contact maps were analyzed as a function of the three phospholipids. Then, we compared the protein sites observed for cholesterol and the three lipids.



**Fig 5. Primary structure of  $\mu$ OR with lipid contacts in the CCh membrane for (A) Chol. (B) POPC respectively.** Each AA of  $\mu$ OR is colored as a function of its contact frequency with the lipids, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD simulations at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K, ranging from yellow (0 %) to red (100 %).

For the CCh membrane, there are more contacts with POPC than with cholesterol which interacts with few AAs (Fig 5).  $\mu$ OR-lipid contacts are similar for both lipids. AAs in H8 interact more with POPC than cholesterol, *i.e.*, F347, R348, F350, C351, and I352 with 60 % minimum of  $\mu$ OR-POPC and less than 20 % for  $\mu$ OR-cholesterol contacts (Fig 5). There is a POPC surface pocket between helices H1, H7, and H8 with F87, M90, Y91, I93, V94, and R95 (H1), F338 (H7), and K344, F347, R348, F350, C351, and I352 (H8). This site is preferred by POPC. Nevertheless, POPC and cholesterol can exchange in the lipid sites at the protein

surface.

The first C2 bead of cholesterol interacts even more than the others (Fig 2) as cholesterol can be parallel or perpendicular to the membrane, which explains the large number of interactions with this particular bead (Fig 5A).

We can observe the reliability of the cholesterol site prediction by comparison of the CRAC and CARC sequences and the AAs interaction profiles. The AAs located in the middle of the sequence are the most important for interactions with tyrosine for the CRAC and tyrosine or phenylalanine for CARC sequences. Three of the five known sequences demonstrate protein-lipid interactions, *i.e.*, CRAC3 (F108 in H2, for 95 and 53 % respectively for POPC and cholesterol), CARC1 (F204 in H4, for 83 and 48 % respectively for POPC and cholesterol), and CARC2 (F239 in H5, for 47 and 49 % respectively for POPC and cholesterol). The major AAs interacting with cholesterol are aromatic, *i.e.*, in H2 (F108 and F123), in H3 (Y149, F152, F156, and Y166), in H4 (W192 and F204), in H5 (F239), in H6 (Y299), and in H7 (F320).

We also observe four other lipid sites, one in H3 for cholesterol (Y149, F152, and F156) and three in H1 (F84 and F87), H4 (F204), and H6 (Y299) for POPC. If we consider structural modifications induced by the lipids on the  $\mu$ OR conformations, the tilt angle of helix H1 does not change, whereas the H4 and H6 tilt angles vary (Table 3).

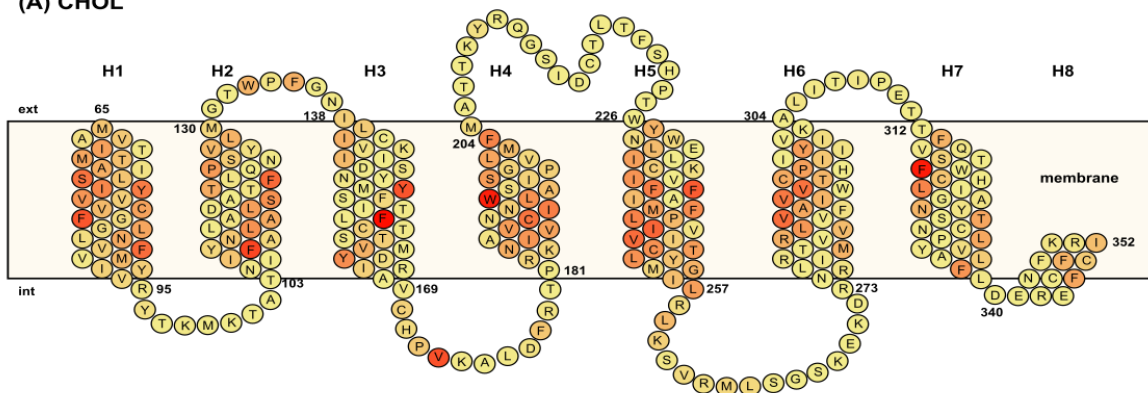
The pocket at the  $\mu$ OR surface, defined by crystallography, has been shown to interact with cholesterol. We verified it with MD, as Y299 in H6 (46 % of  $\mu$ OR contacts) and F320 in H7 (60 % of  $\mu$ OR contacts) often interact with cholesterol (Fig 5A). Movements observed with MD allow to define the lipid pocket made of the following AAs: L324 in H7 and L283, V284, A287, V288, I290, V291, C292, T294, P295, H297, I298, and Y299 in H6. Compared to the crystallographic static view, several others AAs are also noted, as F320 and L324 in H7 and V291, P295,

I298, and Y299 in H6.

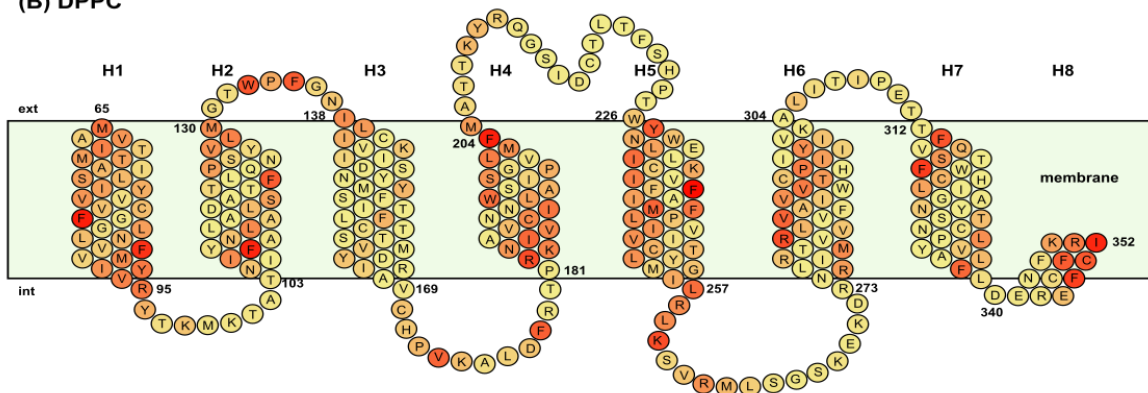
Aromatic AAs in H2, H3, and H4 interact often and more frequently with cholesterol than POPC in H3. We thus hypothesize that there is another lipid site between these three helices as we will show in the last part of the Results.

DPPC is a more rigid lipid than POPC and the DCh membrane is less flexible than CCh. As already observed for the POPC/cholesterol comparison, there are few differences in the lipid interfaces (Fig 6). The previous CRAC3, CARC1, and CARC2 sequences are also noted for cholesterol in the DPPC membrane. Regarding the crystallographic observed interface, cholesterol in DPPC interacts more often with helix H6 than in POPC as mainly seen with R280 (26 and 14 %, respectively) and V284 (57 and 35 %, respectively).

(A) CHOL



(B) DPPC



**Fig 6. Primary structure of  $\mu$ OR with lipid contacts in the DCh membrane for (A) Chol. (B) DPPC respectively.** Each AA of  $\mu$ OR is colored as a function of its contact frequency with the lipids, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K, ranging from yellow (0 %) to red (100 %).

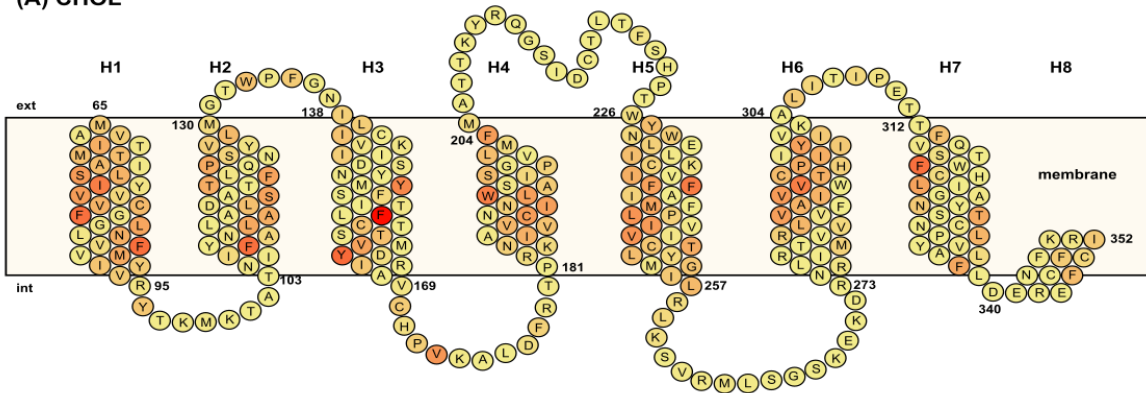
A rigid membrane promotes contacts with lipids as the protein is blocked in less numerous orientations. In return, the lipids prevent the protein to move when they are in the  $\mu$ OR surface pockets. Cholesterol in the DPPC membranes has the same interacting pattern of interactions than in POPC, especially with F156 in H3. In H4, W192 interacts more often with cholesterol in DPPC than in POPC (91 and 47 %, respectively). These marked interactions indicate a more favorable pocket between H3 and H4 for cholesterol in a rigid DPPC membrane than in the POPC one (Fig 6A).

DPPC interacts more with the H1 and H8 helices in the intracellular part, like POPC. Cholesterol in DCh, interacts only with H1, *i.e.*, Y75, S76, I77, F84, and F87 (Fig 6A). There is a common site for lipids in H1 with F84 and F87. As observed in CCh membranes, CRAC and CARC sequences are not only for cholesterol interactions, like CRAC1 and CRAC2 in helix H1 in internal membrane leaflet (Fig 6B).

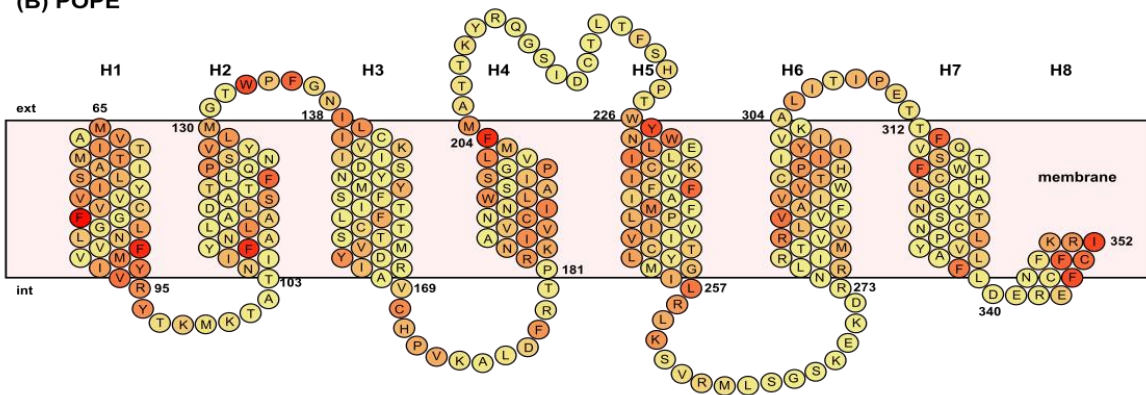
Cholesterol in all membrane types interact similarly with H1, H6, and H7 (Fig 7). H6 and H7 form the crystallographic interface for cholesterol. The  $\mu$ OR-lipid interactions are conserved without distinction between all membrane types with preferred contact AAs: V291 in H6 (47, 49, and 54 % for CCh, ECh, and DCh membranes, respectively) and F320 (H7).



(A) CHOL



(B) POPE



**Fig 7. Primary structure of  $\mu$ OR with lipid contacts in the ECh membrane for (A) Chol. (B) POPE respectively.** Each AA of  $\mu$ OR is colored as a function of its contact frequency with the lipids, as obtained from the 15  $\mu$ s CG MD runs at P = 1.01325 bar and T = 310 K, ranging from yellow (0 %) to red (100 %).

Cholesterol interacts with  $\mu$ OR in ECh in the intracellular part of helix H1, in particular with F84 and F87. This confirms our previous hypothesis made for DPPC with POPE; cholesterol has a preferential site at the H1 surface.

Cholesterol CRAC and CARC sequences are found again with CRAC3 (H2), CARC1 (H4), and CARC2 (H5). The correlation between the AA interaction profiles and helix tilt value is more evident as we see the same profile for  $\mu$ OR in POPE and DPPC for H1, H2, H4, H6, and H7. For H3, the cholesterol interaction with Y166 (58

% in ECh and 42 % in DCh) is sufficient to inverse the trends and to increase the tilt angle of H3 *versus* the decrease for  $\mu$ OR in the DCh membrane.

As already observed for POPC and DPPC, W192 (H4) interacts more with cholesterol than with phospholipids (40 % for POPE and 48 % for cholesterol in ECh membranes and 55 % for DPPC and 91 % for cholesterol in DCh membranes). F237 (H5) makes more contacts with cholesterol in a rigid membrane than in fluid bilayer (64, 50, and 35 % of  $\mu$ OR-cholesterol contacts in DCh, ECh, and CCh, respectively). We assume there are two cholesterol sites or a common site that can be distinguished with the analysis of the lipid movements as will be shown later. We note the common phospholipid site between helices H4 and H5.

To conclude this part, we will first compare the cholesterol sites according to the nature of the phospholipid membranes (Figs 5A, 6A, and 7A). Cholesterol interacts with the transmembrane helices and very little with the intracellular helix H8. Some AAs are common sites for cholesterol independently of the phospholipid membrane types: H2 (F108), H3 (Y149, F152, F156, and Y166), H4 (W192), H6 (V291), and H7 (F320). Cholesterol can also interact specifically with the following AAs, *i.e.*, H2 (F123) in CCh, H1 (F84 and F87), H2 (F123), and H5 (F237) in DCh, and H1 (F84 and F87), and H5 (F237) in ECh.

Several AAs interact more often with cholesterol than phospholipids, *i.e.*, H3 (F152), H4 (W192), H6 (V291), and H7 (F320). These AAs are preferred interfaces for cholesterol allowing to identify specific interaction sites. Two helices of  $\mu$ OR are well-known in the literature to interact with cholesterol: H6 and H7. Our analyses show that cholesterol interacts mainly in the outer leaflet of the membrane, with V291 in H6 and F320 in H7 and less with other AAs in H6, *i.e.*, V284, V288, and Y299 (Figs 5A, 6A, and 7A).

In the second part of our analysis, we focus on the phospholipid sites at the  $\mu$ OR



surface (Figs 5B, 6B, and 7B). As for cholesterol, there are common AAs interacting with all lipids, *i.e.*, H1 (F84 and F87), H2 (F108 and F123), H4 (F204), H5 (L257), H6 (V284), H7 (F338), and H8 (F347, F350, C351, and I352). In the same way as the interactions with cholesterol, AAs interact differently with DPPC and POPE than POPC, *i.e.*, EL1 (W133 and F135), H5 (Y227 and F237), and H7 (F313 and F320). There is a coexistence of specific and non-specific lipid sites at the surface of  $\mu$ OR depending of the structure of the phospholipids.

When focusing on the cholesterol predicted sites CARC (extracellular) and CRAC (intracellular), we observed that cholesterol sites are also used by phospholipids to interact with  $\mu$ OR. Only CARC1 in helix H4 is a privileged site for cholesterol in comparison to all phospholipids. The second extracellular cholesterol site, CARC2, is more often visited by phosphatidylcholines and especially POPC. CRAC1 and CRAC2 in the intracellular part of H1 are confused in one site for phospholipids. Cholesterol interacts more often with AAs located above this common site, *i.e.*, F84 and F87. The phospholipid structures are more adapted to the lipid site at the  $\mu$ OR surface. Moreover, we noted that cholesterol interacts preferentially with phenylalanines in comparison to the other aromatic AAs like tyrosine which are also in the predicted cholesterol sites. Finally, for CRAC3 and CRAC4, also in the intracellular part of  $\mu$ OR, both sites are equally distributed between cholesterol and phospholipids contacts at the surface of the protein.

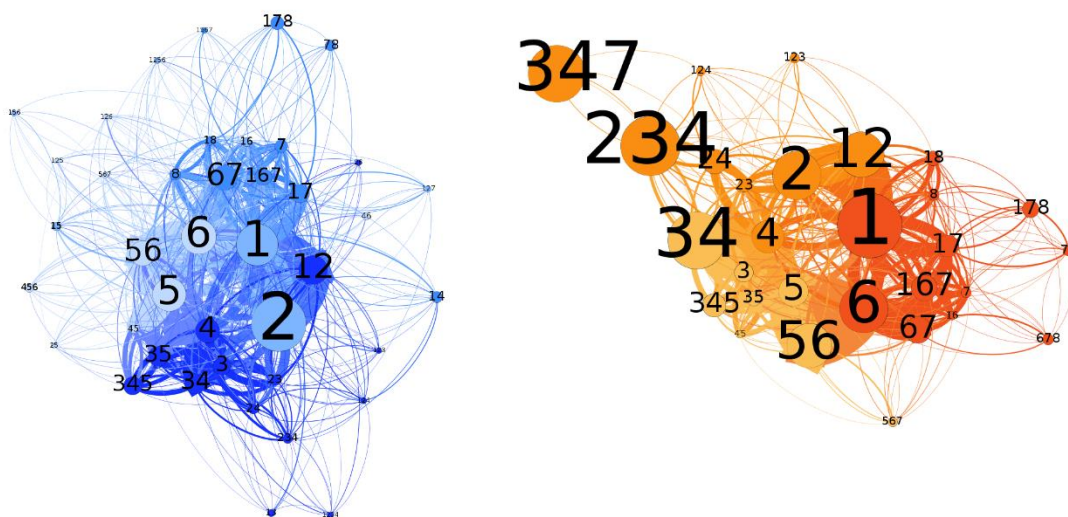
To understand how cholesterol and phospholipids exchange in a lipid site with helix H2 and cholesterol sites with H3 and H4, we will analyze the lipid movements at the  $\mu$ OR surface in the following part.

#### 4.4. Lipid movements at the $\mu$ OR surface

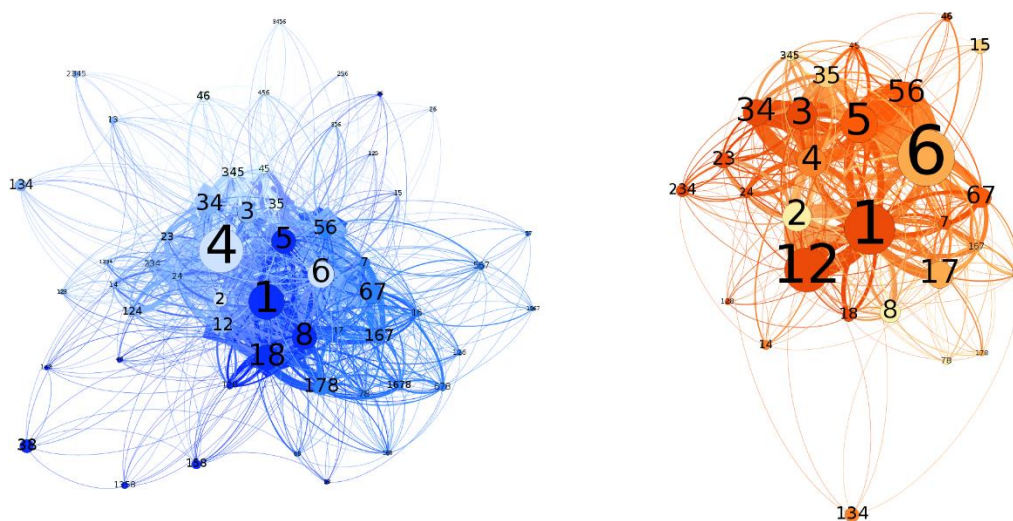
After having identified the AAs interacting with each type of lipid membrane, we

studied which protein sites are preferentially visited by the lipid molecules. Indeed, despite the protein rigidity inferred by the MARTINI model, lipids are free to move and exchange their position in the 3D space. In the present section, we focus on the lipid shell surrounding the membrane protein, both in the internal and in the external layers of the membrane. The preferred contact sites of the lipids and the paths they follow at the protein surface are visualized in Figs 8-10.

(A)



(B)



**Fig 8. Network output obtained using Gephi for CCh.** They are determined from the three 15  $\mu$ s CG MD runs at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K of **(A)** extracellular membrane (POPC at left, Chol at right) and **(B)** intracellular membrane (POPC at left, Chol at right) interacting with  $\mu$ OR for the external and internal membrane layers. Each circle represents a site of  $\mu$ OR, according to the helix label. As an example, 167 stands for helices H1, H6, and H7. The more often a site is visited by lipids, the larger the circle. In the same way, a connection between two nodes is thicker when the lipid transfer frequency between two protein sites is higher. In each network, the node color shade is a function of the clustering results, as described in **Materials and Methods**.

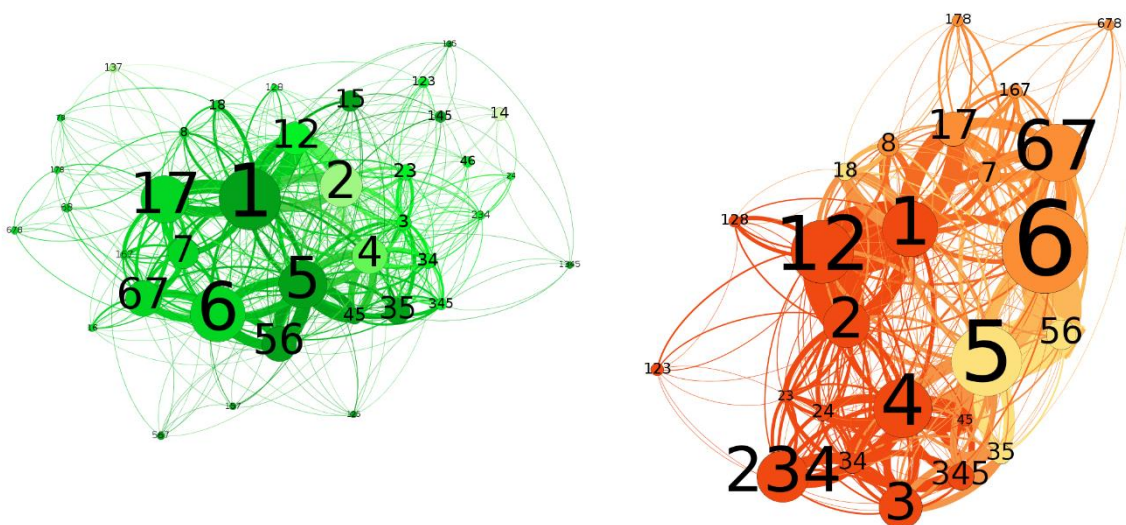
First, we analyzed the lipid movements in the extracellular part of the membrane (Fig 8A). For POPC, the main lipid site is 2, with F123 interacting largely. We hypothesize that F123 is the first  $\mu$ OR contact with lipids. In this cluster of lipid sites, we noted that site 1 and its interactions were already characterized with M65, V66, and I69 (Fig 5B and 8A left). Lipids exchange easily between helices H1 and H2 due to the spatial proximity. Sites 5, 6, and 56 belong to one lipid cluster and bring together the CARC2 site and the AAs: Y227, W228, L231, I234, C235, F237, I238, and F239 in H5 and V291, T294, P295, I298, and Y299 in H6.

Regarding cholesterol, the larger circles are for sites 34, 347, and 234, which are explained by the contact frequency between cholesterol and the site CARC1 in helix H4, *i.e.*, F123 in H2, Y149 and F152 in H3, and F204 and W192 in H4 (Fig 5A). We thus propose that there is a common site for POPC and cholesterol between H2, H3, and H4, with a preferred interface between POPC and H2. Other privileged sites are constituted by sites 1 and 6. They are few contacts formed between the cholesterol and  $\mu$ OR in comparison to POPC and the same interface.

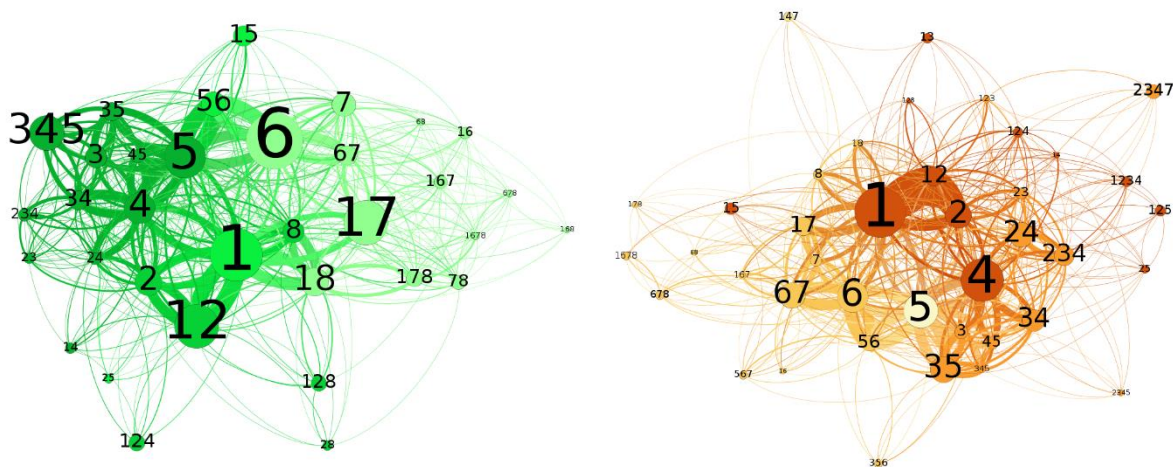
Cholesterol and POPC exchange in their sites at the surface of the protein. When examining the lipid movements in the intracellular leaflet of CCh (Fig 8 B), the most frequented site is interface 4. Lipids interact frequently with AAs: R182, K185, I186, V189, and C190 in helix H4 (Fig 5A). For helix H1, there are two sites for cholesterol, CRAC1 and CRAC2, and they are frequented by lipids as the graphs show with interface 1. F108 in CRAC3 in H2 often interacts with cholesterol; it is illustrated by the interface 12.

For DCh, we began the analysis of the lipid movements in the extracellular part of the membrane (Fig 9A). For DPPC, the larger circles represent sites 1, 17, 6, 5, and 2. We hypothesize there is a DPPC site between H1 and H7 represented by AAs, M65 and I69 in H1, and F313 and F320 in H7 (Fig 6B). A second lipid site is located between H5 and H6, with the CARC2 site in H5, *i.e.*, Y227, I234, F237, I238, and F241 in H5, and V291, P295, and Y299 in H6. The last site 2 is mostly described by F123 in helix H2 (Fig 6B).

(A)



(B)



**Fig 9. Network output obtained using Gephi for DCh.** They are determined from the three 15  $\mu$ s CG MD runs at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K of **(A)** extracellular membrane (DPPC at left, Chol at right) and **(B)** intracellular membrane (DPPC at left, Chol at right) interacting with  $\mu$ OR for the external and internal membrane layers. Each circle represents a site of  $\mu$ OR, according to the helix label. As an example, 167 stands for helices H1, H6, and H7. The more often a site is visited by lipids, the larger the circle. In the same way, a connection between two nodes is thicker when the lipid transfer frequency between two protein sites is higher. In each network, the node color shade is a function of the clustering results, as described in **Materials and Methods**.

For cholesterol, the main sites are 6, 5, 67, and 12. The site defined by helices H5 and H6 is a common site for POPC and cholesterol. Another site with H6 is represented by site 67 and AAs, F320 and L324 in H7. The second site is a combination of helices H1 and H2 *versus* H7 for DPPC. It is explained by the

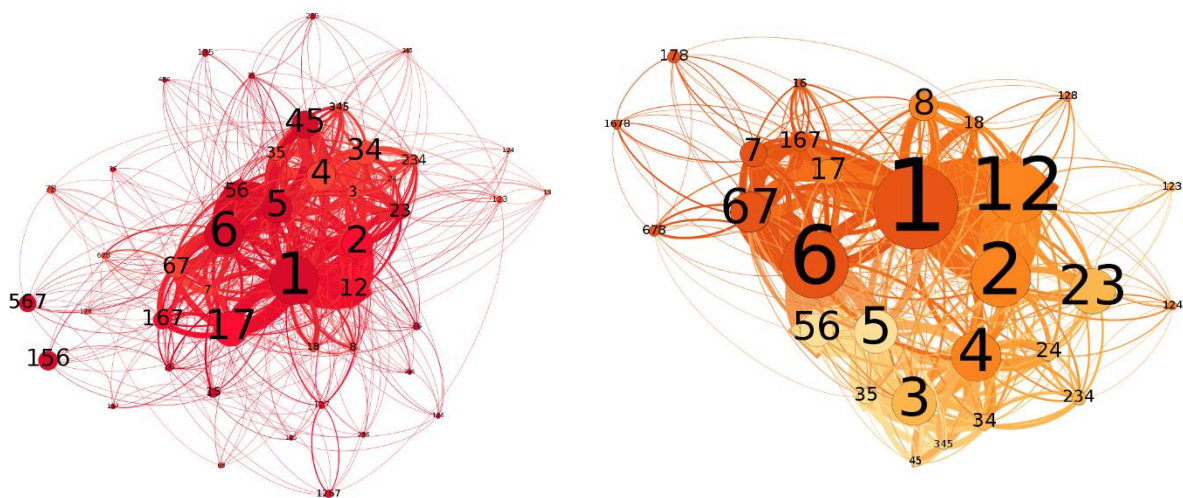


opposite tilt angle of H2 which exposes a new site that is more favorable for lipids. Cholesterol in DCh membranes is well predicted in the CARC1 and CARC2 sites as the contacts are privileged for these localizations.

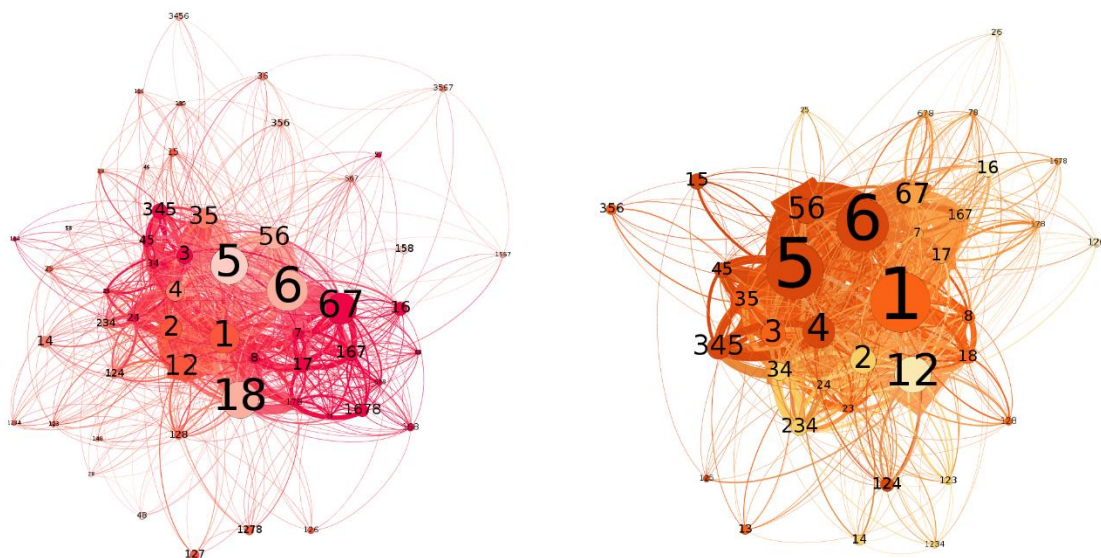
The analysis of the lipid sites in the intracellular part of the DCh membranes (Fig 9B) shows that the principal sites for DPPC are 6, 1, 12, 17, and 5. Sites 1, 12, and 17 form a lipid site cluster based on helix 1. This lipid site defined for DPPC is similar as for POPC with AAs located in CRAC1, CRAC2, and CRAC3 sequences for H1 and H2, with F338 in H7 (Fig 6B). The last predicted site CRAC4 in H5 is less attended by DPPC. L257 in H5 is spatially close to the AAs in H6; we hypothesize they form a lipid site at the  $\mu$ OR surface.

Finally, for cholesterol, sites 1, 4, 5, and 6 are predominant in the graph. Cholesterol does not interact with the AAs in CRAC1 and CRAC2 in H1 like for DPPC, but with the AAs located above these sites, *i.e.*, F84 and F87 (Fig 6A). Moreover, cholesterol interacts with AAs in the CRAC3 site, like F108 in H2. Regarding site 4, there are less interactions with cholesterol than with DPPC for AAs, *i.e.*, R182, K185, I186, V189, C190, and I193 in H4 (Fig 6A). It is the opposite for site 5 with cholesterol interacting in CRAC4 site with V250, L257, and K260 in H5.

**(A)**



**(B)**



**Fig 10. Network output obtained using Gephi in ECh.** They are determined from the three 15  $\mu$ s CG MD runs at  $P = 1.01325$  bar and  $T = 310$  K of **(A)** extracellular membrane (POPE at left, Chol at right) and **(B)** intracellular membrane (POPE at left, Chol at right) interacting with  $\mu$ OR for the external and internal membrane layers. Each circle represents a site of  $\mu$ OR, according to the helix label. As an example, 167 stands for helices H1, H6, and H7. The more often a site is visited by

lipids, the larger the circle. In the same way, a connection between two nodes is thicker when the lipid transfer frequency between two protein sites is higher. In each network, the node color shade is a function of the clustering results, as described in **Materials and Methods**.

For ECh, lipid movements were observed in the extracellular part of the membrane (Fig 10A). For POPE, the main nodes are sites 1, 17, 5, and 6. As already noted for the other phospholipids, there is a lipid site at the surface of  $\mu$ OR between helices H1 and H7, with M65, V66, I69, and T70 in H1, F313 and F320 in H7 (Fig 7B). In the same way, the site between H5 and H6 is found again for POPE as for POPC and DPPC.

For cholesterol, sites 1, 12, and 6 are privileged. As in DCh membranes, cholesterol in ECh membranes more favorably interacts with H1 and H2 and phospholipids, *i.e.*, DPPC or POPE, with H1 and H7 due to the helix tilt of H2. The CARC2 site in H5 is not often visited by cholesterol and it is preferred by POPE. For CCh and DCH membranes, there is a site between H5 and H6 which defines a site at the  $\mu$ OR surface. In the case of ECH membranes, the most important interactions are V291 in helix H6 (Fig 7A). F237 in H5 and F320 in H7 complete the definition of the lipid site started with V291 in H6.

POPE interacts in sites 6, 5, and 18 at the surface of  $\mu$ OR in the intracellular part of the ECh membrane. There are more interactions for POPE than with DPPC with helix H6, *i.e.*, R280 and V284. In site 5, L257, R258, L259, and K260 interact with POPE (Fig 7B). In the last predominant site 18, POPE interacts with H1 and H8, *i.e.*, F84 and F87 in H1 and F347, F350, C351, and I352 in H8. For cholesterol, we note the same lipid sites, except site 12 for cholesterol in place of site 18 for POPE. It is the same observation for all membranes. We hypothesize that either the phospholipids interact too strongly with the AAs of H8 *versus* cholesterol or that



lipid site 18 is not favorable for cholesterol interactions.

## 5. Conclusion and discussion

In this work, we performed three 5  $\mu$ s coarse-grained (CG) molecular dynamics (MD) simulations to illustrate the effect of three types of lipid membranes, POPC, DPPC, and POPE, with 30 % of cholesterol on the  $\mu$  opioid receptor ( $\mu$ OR) 3D structure, compared to the same systems without cholesterol. The addition of cholesterol in the phospholipid membranes clearly affects the  $\mu$ OR structure. This was first noted by comparing the helix tilt angle value in the phospholipid membranes alone (POPC, DPPC, and POPE), and with 30% of cholesterol (CCh, DCh and ECh). The transmembrane helix movements are changed by cholesterol. It is not the case for helix H8 located between the membrane and the cytoplasmic environment. The phospholipid nature modifies the  $\mu$ OR-lipid interactions like we already mentioned in a previous paper [27]. We remind here that CG methods gave comparable results to all-atom simulations [27].

Cholesterol presents two faces: a soft one and a rough one which are smoothed by the CG method. Nevertheless, one face interacts more with the protein AA beads than the other. We therefore hypothesize that both soft and rough faces are conserved in the CG structure of cholesterol. The addition of cholesterol leads to more rigid membranes and so increases the number of contacts between  $\mu$ OR and the lipids. Moreover, cholesterol in membranes does not change the interaction profiles of the phospholipids with the protein. Thus, phospholipids can always access to their lipid sites at the  $\mu$ OR surface without being in competition with cholesterol.

The first head bead of cholesterol interacts more than the other cholesterol beads with the AA beads, knowing it can orient in parallel or in perpendicular to the

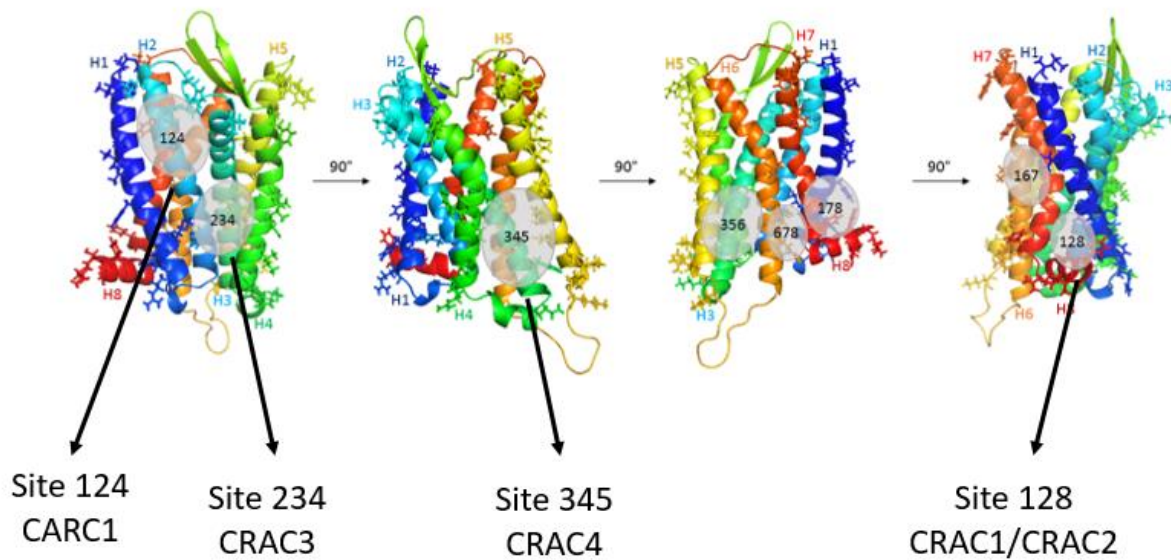
phospholipids inside the membrane. It is coherent with the distribution of the AAs interacting with cholesterol at the  $\mu$ OR surface.

Concentrating on the cholesterol predicted sites, CRAC and CARC, we have shown that CRAC sites are located in the intracellular leaflet of the membrane, *i.e.*, CRAC1 and CRAC2 in H1, CRAC2 in H2 and CRAC3 in H5. Sites CARC1 in H4 and CARC2 in H5 are located in the extracellular leaflet of the membrane.

First, we noted that the  $\mu$ OR AAs interact little with cholesterol in CRAC1 and CRAC2 sites in particular. However, cholesterol in DCh and ECh membranes interact with the AAs located above the CRAC1 site, *i.e.*, F84 and F87. For CRAC3 and CARC1 sites, only phenylalanines make contacts, F108 (in H2) and F204 (in H4), respectively. Finally, CARC2 and CRAC4, located in helix H5 present more interactions in phosphatidylcholine membranes than in ECh. On the other hand, POPE interacts more with all AAs in H5, *i.e.*, Y227 and W228 than with the other lipids.

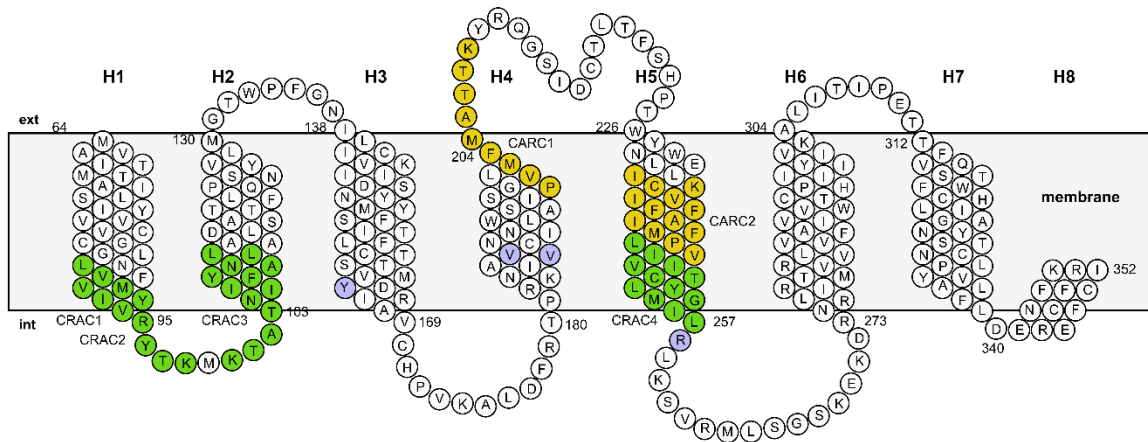
Other cholesterol sites have been highlighted considering the lipid movements study, wherein we remarked the following interfaces: 17, 234, 67, and 12. Helix H6 is preferred in DCh membranes with three valines, *i.e.*, V294, V288, and V291 because DPPC rigidifies the membranes.

Predicted cholesterol sites are preferentially used by phospholipids, like CRAC1 and CRAC2 sites in H1 which form one common site. Other phospholipid interfaces exist; they are formed by AAs in different helices located nearby each other. Helices H1 and H6 are important for  $\mu$ OR-lipid contacts as they form pockets with the other helices as H2, H7, and H8 for H1 and H5 and H7 for H6. These sites are presented in Fig 11.



**Figure 11: Schematic structure of  $\mu$ OR with lipid sites and CARC/CRAC sequences.** In grey, the lipid sites identified by the network graph obtained by Gephi. Each circle represents a site of  $\mu$ OR, according to the helix label.

We conclude our analysis by stressing the global interest to use theoretical methods to precisely predict the interactions between cholesterol and protein at the AA level. The lipid sites are defined by two-dimensional structures and not 3D ones, so the pockets formed by several helices are not taken into account for the prediction. As an example, with respect to the CRAC definition, L/V-X<sub>1-5</sub>-Y-X<sub>1-5</sub>-K/R, another site between helices H3 (Y166), H4 (V187 and V189), and H5 (R258) appears. This site is depicted in Fig 12.



**Fig 12. Primary structure of  $\mu$ OR with cholesterol predicted sites.** CRAC and CARC sites are in green and yellow, respectively. CRAC1 and CRAC2 are superimposed in the intracellular part of helix H1. The new site is defined in purple on helices H3, H4, and H5.

This opens the research field of protein-cholesterol interactions by the addition of 3D site at the protein surface *versus* predicted sites concentrated on one helix. Classical MD simulations show a real interest for the prediction of lipid sites and the observation of the movements; as well as for, the competition between phospholipids and cholesterol. In the future, it would also be interesting to correlate these new cholesterol sites to dimerization sites.

### Acknowledgements

MAA thanks the Belgian National Fund for Research (F.N.R.S.) for her F.R.I.A. doctoral fellowship. The research used resources of the “Plateforme Technologique de Calcul Intensif (PTCI)” () located at the University of Namur, Belgium, which is supported by the FNRS-FRFC, the Walloon Region, and the University of Namur (Conventions No 2.4520.11, GEQ U.G006.15, 1610468, and RW/GEQ2016). The PTCI is member of the “Consortium des Equipements de

Calculs Intensifs (CECI)" (). All authors thank Prof A. Laaksonen (Stockholm University) and Dr. M. Fossépré (Mons University) for fruitful discussions.

## References

- [1] Nishida N., Osawa M., Takeuchi K., Imai S., Stampoulis P., Kofuku Y., Ueda T., Shimada I. Functional dynamics of cell surface membrane proteins. *J. Magn. Res.* 2014; 241: 86-96
- [2] Laganowsky A., Reading E., Allison T. M., Ulmschneider M. B., Degiacomi M. T., Baldwin A. J., Robinson C. V., Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function, *Nature*, 2014; 510: 172-180.
- [3] Gimpl G. Interaction of G protein coupled receptors and cholesterol. *Chem. Phys.Lipids.* 2016; 199:61-73.
- [4] Genheden S., Essex J. W., Lee A. G. G protein coupled receptor interactions with cholesterol deep in the membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2017; 1859: 268–281
- [5] Guixà-González R., Albasanz J. L., Rodriguez-Espigares I., Pastor M., Sanz F., Martí-Solano M., Manna M., Martinez-Seara H., Hildebrand P. W., Martín M., Selent J. Membrane cholesterol access into a G-protein-coupled receptor. *Nature Communications.* 2017;8:14505
- [6] Salas-Estradas L. A., Leioatts N., Romo T. D., Grossfield A. Lipids alter rhodopsin function via ligand-like and solvent-like interactions. *Biophys. J.* 2018; 114: 355-367
- [7] Paila Y. D., Chattopadhyay A., The function of G-protein coupled receptors and membrane cholesterol: specific or general interaction?, *Glycoconj. J.*, 2009, 26: 711-720.
- [8] Chattopadhyay A., GPCRs: lipid-dependent membrane receptors that act as

drug targets, *Adv. Biol.*, 2014,143023.

[9] Lagane B., Gaibelet G., Meilhoc E., Masson J.-M., Cézanne L., Lopez A., Role of sterols in modulating the human  $\mu$ -opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 33197-33200.

[10] Xu W., Yoon S.-I., Huang P., Wang Y., Chen C., Chong P. L.-G., Liu-Chen L.-Y., Localization of the  $\kappa$ -opioid receptor in lipid rafts, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 317: 1295-1306.

[11] Huang P., Xu W., Yoon S.-I., Chen C., Chong P. L.-G., Liu-Chen L.-Y., Cholesterol reduction by methyl- $\beta$ -cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 73: 534-549.

[12] Manglik A., Kruse A. C., Kobilka T. S., Thian F. S., Mathiesen J. M., Sunahara R. K., Pardo L., Weis W. I., Kobilka B. K., Granier S., Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist, *Nature*, 2012, 485: 321-327.

[13] Song Y., Kenworthy A. K., Sanders C. R., Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins, *Protein Science*, 2014, 23: 1-22.

[14] Huang W., Manglik A., Venkatakrisnan A. J., Laeremans T., Feinberg E. N., Sanborn A. L., Kato H. E., Livingston K. E., Thorsen T. S., Kling R. C., Granier S., Gmeiner P., Husbands S. M., Traynor J. R., Weis W. I., Steyaert J., Dror R. O., Kobilka B. K., Structural insights into micro-opioid receptor activation, *Nature*, 2015, 524: 315-321.

[15] Fantini J., Di Scala C., Baier C. J., Barrantes F. J., Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016, 199: 52-60.

[16] Hanson, M. A., Cherezov V., Griffith M. T., Roth C. B., Jaakola V. P., Chien Y. T., Velasquez J., Kuhn P., Stevens R. C., A specific cholesterol binding site is

established by the 2.8Å structure of the human beta2-adrenergic receptor, *Structure*, 2008, 16: 897-905.

[17] Fossépré M., Leherte L., Laaksonen A., Vercauteren D. P., On the modularity of the intrinsic flexibility of the  $\mu$  opioid receptor: a computational study, *PLoS ONE*, 2014, 9: e115856.

[18] MacKerell A. D. Jr., Feig M., Brooks C. L. III, Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.*, 2004, 25: 1400-1415.

[19] Klauda J. B., Venable R. M., Freites J. A., O'Connor J. W., Tobias D. J., Mondragon-Ramirez C., Vorobyov I., MacKerell A. D. Jr., Pastor R. W., Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114: 7830-7843.

[20] Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W., CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.*, 2009, 29: 1859-1865.

[21] Humphrey W., Dalke A., Schulten K., VMD-Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, 1996, 14: 33-38.

[22] Marrink S. J., de Vries A. H., Mark A. E., Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108: 750-760.

[23] Marrink S. J., Risselada H. J., Yefimov S., Tieleman D. P., de Vries A. H., The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111: 7812-7824.

[24] Monticelli L., Kandasamy S. K., Periole X., Larson R. G., Tieleman D. P., Marrink S. J., The MARTINI coarse grained force field: extension to proteins, *J. Chem., Theory Comput.*, 2008, 4: 819-834.

[25] Angladon M.-A., Fossépré M., Leherte L., Vercauteren D. P. Interaction of POPC, DPPC, and POPE with the  $\mu$  opioid receptor: A coarse-grained molecular

dynamics study. PloS One. 2019; 14:e0213646

[26] Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E, Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L., Schulten K., Scalable molecular dynamics with NAMD, J. Comput. Chem., 2005, 26: 1781-1802.

[27] Glykos N. M., Carma: a molecular dynamics analysis program, J. Comput. Chem., 2006, 27: 1765-1768.

[28] Dahl A. C. E., Chavent M., Sansom M. S. P., Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction, Bioinformatics, 2012, 16: 2193-2194.

[29] Sengupta D., Chattopadhyay A., Identification of cholesterol binding sites in the serotonin 1A receptor, J. Chem. Phys. B, 2012, 116: 12991-12996.

[30] De Jong D. H., Periole X., Marrink S. J., Dimerization of amino acid side chains: lessons from the comparison of different force fields, J. Chem. Theory Comput., 2012, 8: 1003-1014.

[31] Bastian M., Heymann S., Jacomy M., Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks, International AAAI Conference on weblogs and social media, 2009.

[32] Blondel V. D., Guillaume S.-L., Lambiotte R., Lefebvre E., Fast unfolding of communities in large networks, J Stat Mech: Theory Exp, 2008: P10008.

[33] Gimpl G., Chemistry and Physics of Lipids, 2016, 199:61-73.

[34] Laganowsky A., Reading E., Allison T. M., Ulmschneider M. B., Degiacomi M. T., Baldwin A. J., Robinson C. V., Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function, Nature, 2014, 510: 172-180.

[35] Paila Y. D., Chattopadhyay A., The functions of G-protein coupled receptor and membrane cholesterol: specific or general interactions?, Glycoconj. J., 2009, 26: 711-720.





## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat vise à établir les interactions entre le récepteur opioïde  $\mu$  ( $\mu$ OR) et son environnement lipidique. Des études préliminaires concernant l'influence du cholestérol sur  $\mu$ OR ont clairement montré un couplage entre la localisation de  $\mu$ OR dans les microdomaines (Lagane et al., 2000 ; Xu et al., 2006, Lopez et Salomé, 2009 ; Saulière-Nzeh et al., 2010) et le comportement pharmacologique du récepteur (Gaibelet et al., 2008 ; Zheng et al., 2008).

De plus, la dimérisation de  $\mu$ OR présente un rôle important au niveau de sa fonction. L'interaction entre un palmitate et les hélices H3/H4 de  $\mu$ OR ayant été validée expérimentalement et théoriquement, c'est un argument supplémentaire pour étudier spécifiquement les interactions entre le récepteur et les lipides (Zheng et al., 2012 ; Marino et al., 2016).

L'hypothèse de départ de notre travail de thèse est la suivante : comment la fonction et la structure de la protéine  $\mu$ OR sont-elles influencées par l'environnement lipidique ?

La modulation des protéines par les lipides est de mieux en mieux connue et l'intérêt pour la compréhension des mécanismes augmentent avec une précision au niveau atomique. Une grande variété de techniques expérimentales existe pour caractériser les propriétés physicochimiques et biochimiques des systèmes protéine-membrane, telles que la spectrométrie de masse, la spectroscopie optique, la résonance magnétique nucléaire ou la cristallographie aux rayons X (Huster et al., 2013 ; Muller et al., 2019).

Ces techniques ont énormément enrichi notre connaissance des interactions protéine-lipides mais il est difficile d'obtenir des données pour des résolutions à la

fois spatiales et temporelles suffisantes. La dynamique moléculaire (DM) permet de combler ce manque d'informations dynamiques. De nos jours, il est en effet possible d'atteindre des temps de simulations de 1  $\mu$ s avec une précision atomique en DM tout-atomes (AA) dans des environnements lipidiques de plus en plus complexes (Muller *et al.*, 2019).

On peut aussi augmenter le temps de simulation en diminuant la résolution du système. Une méthode de choix est la transformation du système AA en gros-grains (GG), *via* le champ de forces MARTINI conçu à la base spécialement pour les lipides (Marrink *et al.*, 2004). Il est ainsi possible de gagner 2 à 3 ordres de grandeurs de temps de simulation avec la simplification du système.

Dans notre cas, il était nécessaire de satisfaire plusieurs critères : les interactions entre la protéine devaient être réalisées sur des temps équivalents à ceux présentés dans la littérature avec une moyenne d'1  $\mu$ s en 2014, la membrane devait être assez grande avec une couche d'eau suffisante pour que les protéines puissent bouger sans interagir entre elles. Ces critères ont été satisfaits par l'utilisation du GG avec le champ de forces MARTINI.

Mentionnons que d'autres alternatives ont été présentées dans la littérature telles que ELNEDyn (Périole *et al.*, 2009) et GoMARTINI (Poma *et al.*, 2017). Ces méthodes ont l'avantage de tenir compte de la flexibilité de la protéine mais d'avoir des temps de simulation courts. GoMARTINI n'existait pas encore lorsque nous avons réalisé nos simulations de DM (entre 2014 et 2016). ELNEDyn n'est pas spécialisé pour les lipides alors que nous étudions les interactions protéine-lipides.

Les premières simulations, dans les années 1990, utilisaient du DPPC. Ce lipide qui forme une phase ordonnée du fait de la structure des chaînes acyles saturées, est l'un des plus employés. Les phospholipides représentent la plus importante classe des lipides au sein de la membrane plasmique humaine et parmi eux le POPC et le POPE sont majoritaires ; ils sont aussi choisis préférentiellement aux autres types de lipides pour réaliser des simulations de DM (Marrink *et al.*, 2019). Ces considérations ont motivé notre choix de lipides pour construire les trois systèmes de base étudiés dans cette thèse : le POPC, le POPE et le DPPC. Le cholestérol étant un lipide régulateur de la structure de la membrane en fonction de sa concentration et de la température ainsi qu'un composant essentiel des radeaux lipidiques, il a aussi été intégré aux membranes de base pour compléter cette étude.

En 2018, il est possible d'atteindre des temps de simulations de 40  $\mu$ s avec une membrane composée d'environ 20 000 lipides, dont 63 espèces différentes avec le champ de forces MARTINI (Corradi *et al.*, 2018). Ceci a permis d'appréhender l'impact d'un phospholipide chargé négativement, tel que la phosphatidylsérine, ou d'autres types de lipides tels que les sphingomyélines qui sont aussi des composants majeurs des radeaux lipidiques.

Les acides gras sont aussi des composants de la membrane, par leur structure plus simple que les phospholipides, ils rentreront probablement en compétition avec le cholestérol (Chol) pour les sites d'interactions identifiés dans la seconde partie des Résultats. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ont autant été co-cristallisés avec des acides gras que des phospholipides ou du cholestérol (Jaakola *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2010 ; Thompson *et al.*, 2012 ; Hollenstein *et al.*, 2013 ; Wacker *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2013 ; Doré *et al.*, 2014 ; Wu *et al.*, 2014 ; Yin *et al.*, 2015)

Bennett et ses collaborateurs indiquaient en 2018 que MARTINI permettait bien de reproduire la distribution générale des lipides dans les phases gel et fluide de la membrane mais qu'il n'est pas assez précis pour spécifier les interactions au niveau atomique impliquant la formation de domaines dans la membrane (Bennett *et al.*, 2018).

Le but de notre thèse a donc été de caractériser les interactions  $\mu$ OR-lipides pour mieux comprendre le mécanisme d'action du récepteur. Sachant que  $\mu$ OR est une protéine membranaire, deux phénomènes entrent en jeu : les interactions générales comme celles induites par la modification des propriétés de la membrane par la dimérisation de protéines et les interactions spécifiques liées aux sites d'interactions des lipides à la surface de la protéine (Corradi *et al.*, 2019).

Dans un premier temps, nous nous sommes concentré sur les interactions générales qui sont provoquées par le mésappariement hydrophobe et qui provoquent la dimérisation comme pour le récepteur  $\beta$ 2-adrénérgique (Fantini et Barrantes, 2013). La protéine expose son cœur hydrophobe à l'extérieur de la membrane et l'épaisseur de la bicouche lipidique n'est pas suffisante pour couvrir les acides aminés (AAs) hydrophobes et inversement (Gahbauer et Böckmann, 2016). Plusieurs stratégies sont possibles pour réduire le mésappariement hydrophobe, parmi lesquels l'inclinaison des hélices et de la protéine, l'oligomérisation, le déplacement de la protéine vers une zone de la membrane plus ou moins épaisse et l'adaptation de l'épaisseur de la membrane par les lipides eux-mêmes (augmentation de la proportion de rotamères gauches).

Tous les phénomènes coexistent. Sachant que nous voulons étudier les sites d'interactions précis des lipides à la surface de la protéine, l'adaptation la plus

importante est celle liée aux mouvements de la protéine. En effet, l'inclinaison des hélices va ouvrir ou fermer des sites potentiels pour les lipides. Ainsi, nous avons illustré l'adaptation de  $\mu$ OR à son environnement par la mesure de l'angle *tilt* de chacune des hélices. Ces mesures montrent que les hélices s'inclinent entre 10 et 20°, libérant ou fermant ainsi un site d'interaction sans distinction pour la nature lipidique des membranes étudiées (POPC, POPE, DPPC, POPC + Chol, POPE + Chol et DPPC + Chol).

Bien que le *fold* de  $\mu$ OR soit maintenu par les adaptations des hélices, nous avons aussi vérifié si les lipides participaient à la réduction du mésappariement hydrophobique. Pour cela, nous avons calculé les contacts entre  $\mu$ OR et chaque grain lipidique. On constate que les lipides saturés (DPPC) établissent moins de contacts avec le récepteur que les lipides insaturés (POPC et POPE).

Un autre moyen de mesurer l'adaptation de la membrane à la longueur de la protéine est le calcul de l'épaisseur de la bicouche lipidique. Ce calcul a bien été réalisé mais nous ne le présentons pas car les résultats n'ont pas été quantitativement exploitables. L'observation qualitative montre que la membrane est globalement plus épaisse autour de la protéine.

A un niveau plus détaillé, des sites d'interactions précis pour les lipides ont été observés dans les structures cristallines, comme les sites pour le cholestérol, définis par les séquences CRAC et CARC : (L/V)-X<sub>1-5</sub>-(Y)-X<sub>1-5</sub>-(K/R) du N- au C-terminal. CRAC étant localisé au niveau de la couche interne de la membrane et CARC en miroir au niveau externe. Ces sites sont très étudiés car il est aisé de les identifier dans la séquence primaire. Pour autant, de nombreuses études ont montré que le cholestérol n'interagissait pas avec ces séquences mais parfois sur d'autres sites ([Epanand, 2008](#) ; [Gimpl, 2016](#)).

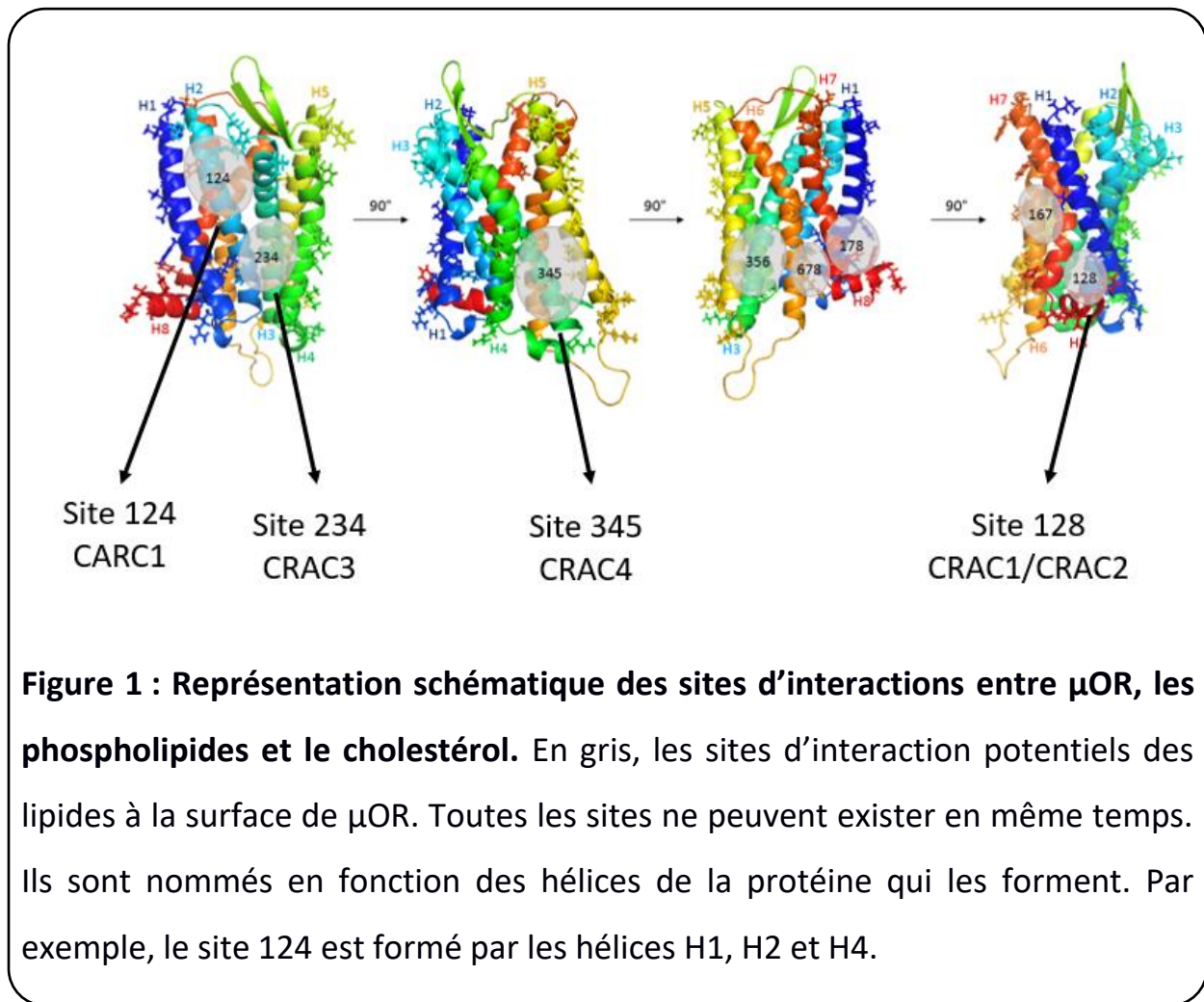
Nous avons dans un premier temps caractérisé par DM les sites d'interactions pour les phospholipides (DM POPC, POPE et DPCC) et nous les avons ensuite comparés avec ceux observés pour le cholestérol (DM POPC + Chol, POPE + Chol et DPPC + Chol). Dans la littérature, il est mentionné que la mesure standard pour qualifier les interactions protéine-lipides les plus précises est le temps d'occupation d'un lipide dans un site présent à la surface de la protéine (Corradi et al., 2019). Pour autant, les temps d'occupation sont calculés pour des simulations de DM considérés comme « longs » en 2018 mais qui ne représentent pas encore la réalité biologique et sans tenir compte de l'affinité de liaison protéine-lipide.

Ayant conscience de cette limitation, nous avons choisi de réaliser deux analyses complémentaires : le nombre de contacts entre les lipides et chaque AA de  $\mu$ OR, ce qui permet d'identifier les sites en 2D et les mouvements des lipides autour de la protéine par un graphe en réseau. Ainsi nous pouvons identifier un site 3D lorsque les lipides interagissent fréquemment et caractériser les AAs les plus importants de ces mêmes sites.

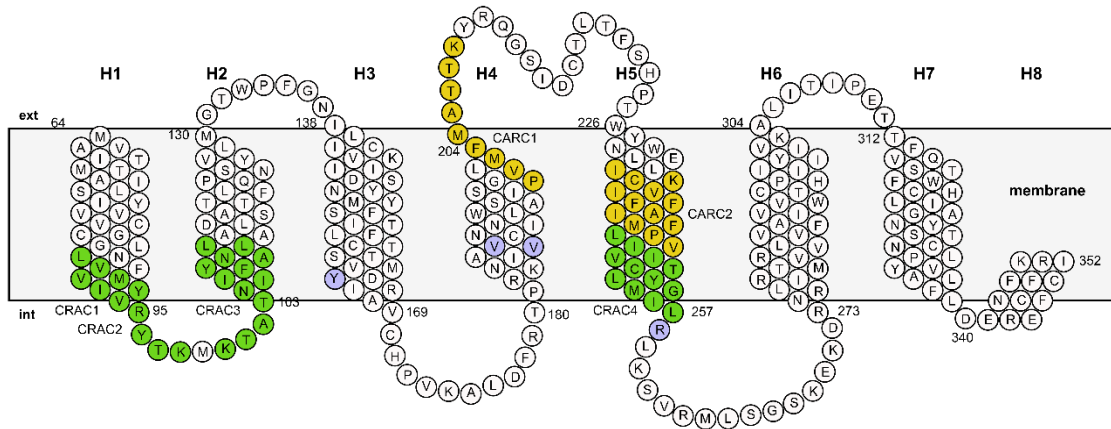
Par exemple, on peut observer les mouvements des lipides entre les hélices H5 et H6, en distinguant l'ordre dans lesquels les interactions de la tête et des chaînes acyles des lipides s'accomplissent. En comparaison, le temps d'occupation est calculé le plus souvent, pour le lipide qui interagit le plus longtemps avec la protéine. Le site est caractérisé par des images tirées de la simulation (Cang et al., 2013).

Dans ce travail, nous avons identifié huit sites d'interactions pour les phospholipides, principalement avec les hélices H1, H4 et H6, présentés dans la **Figure 1**.





Il est intéressant de comparer ces sites avec les séquences prédites pour le cholestérol, CRAC et CARC, et de visualiser un nouveau site 3D (**Figure 2**).



**Figure 2 : Structure primaire de  $\mu$ OR avec les sites d'interactions du cholestérol.** En vert, les sites CRAC. En jaune, les sites CARC. En violet le nouveau site 3D pour le cholestérol.

Les phospholipides accèdent toujours aux sites identifiés au départ (**Figure 1**). Ces sites font aussi partie des séquences prédites pour les interactions protéine-cholestérol et on peut les mettre en parallèle :

- CRAC1/CRAC2 et le site 128 ;
- CRAC3 et le site 234 ;
- CARC1 et le site 124 ;
- CRAC4 et le site 345 ;
- Le nouveau site pour le cholestérol (en violet sur la **Figure 2**) et le site 345.

Comme nous l'avons présenté auparavant dans la Conclusion, les séquences prédites pour le cholestérol ne correspondent pas aux résultats issus des DMs (Corradi *et al.*, 2019). Cependant, dans le cas de CRAC1 et CRAC2, les interactions sont situées au-dessus dans l'hélice H1. Pour les sites CRAC3 et CARC1, les interactions sont majoritairement effectuées avec la phénylalanine.

Les interactions protéine-lipides sont un moyen de réduire le mésappariement hydrophobique en induisant l'oligomérisation des protéines. On peut ainsi faire le lien avec les interfaces de dimérisation de  $\mu$ OR qui sont connues : H1/H2/H8 et H5/H6. Le cholestérol est un acteur clé des phénomènes de dimérisation (Fantini et Barrantes, 2013 ; Pluhackova et al., 2016) et donc de l'activation de plusieurs RCPGs. De plus, le cholestérol est co-cristallisé avec de nombreux RCPGs, famille dont  $\mu$ OR fait partie (Cherezov et al., 2008 ; Manglick et al., 2012 ; Wacker et al., 2013 ; Wu et al., 2014 ; Zhang et al., 2014).

Les résultats de cette thèse et les résultats présentés la littérature encouragent l'approfondissement des études sur  $\mu$ OR visant à la caractérisation des interactions protéine-lipides qui ont lieu au moment de la dimérisation. L'étude des interfaces entre les dimères  $\mu$ OR actif et  $\mu$ OR inactif et l'identification des sites d'interaction pour les lipides de ce travail constitueront le point de départ d'un nouveau travail de recherche (Marino et al., 2016).

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées.

Une des perspectives de ce travail est d'utiliser les données restantes des simulations de DM de cette thèse pour comparer les résultats avec des simulations de DM de  $\mu$ OR dans des membranes complexes, tel POPC/POPE/DPPC et de les comparer avec POPC/POPE/DPPC+30 % de cholestérol. Pour s'approcher de la composition des radeaux lipidiques et donc d'une membrane rigide, il est aussi possible de réaliser des simulations de DM GG avec la phosphatidylsérine et une sphingomyéline pure, puis à nouveau avec 30 % de cholestérol.

Une autre perspective de ce travail est l'étude des interfaces de dimérisation de  $\mu$ OR lorsque les sites identifiés (H1/H2/H8 et H5/H6 principalement) sont occupés

par d'autres types de lipides que le cholestérol. Dès lors l'effet observé sur le récepteur actif et inactif devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'activation.

Pour valider les interactions avec les AAs identifiés dans notre étude, il serait également intéressant de modéliser  $\mu$ OR en remplaçant chacun à leur tour un des AAs, identifiés dans les interactions  $\mu$ OR-lipides de ce travail, par une alanine, AA neutre par excellence et par un AA possédant des propriétés équivalentes. Ainsi, si les interactions  $\mu$ OR-lipides ne sont pas conservées avec l'alanine, on pourrait en déduire que l'AA remplacé est réellement important. Si le remplacement de l'AA, par un autre aux propriétés équivalentes, ne modifie pas les interactions protéine-lipides alors l'interaction n'est pas spécifique. La précision de la DM sera primordiale, il faudra donc revenir aux méthodes TA. Le temps de calcul pourra être réduit puisque le résultat recherché est spécifique (interactions entre un AA spécifique et les lipides).

Enfin, les études réalisées dans cette thèse pourraient servir à créer un protocole de *docking* à partir des données de la DM GG ou TA. Pour cela, il conviendrait de collecter les informations sur la poche principale du ligand (volume, forme, AAs proches), de classer les poches par *clustering* et d'extraire les coordonnées de la poche la plus représentative pour chaque *cluster*. Ces poches, une fois modélisées, donneraient des informations clés sur l'ensemble des formes possibles de la poche du ligand et donc de nouvelles possibilités pour concevoir de nouveaux médicaments.



## BIBLIOGRAPHIE GENERALE



**Ananthan S.** Opioid ligands with mixed  $\mu/\delta$  opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 2006; 8: E118-E125

**Audet M, Bouvier M.** Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*. 2012; 151: 14-23

**Badiani A, Belin D, Epstein D, Calu D, Shalam Y.** Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nature reviews*. 2011; 12: 685-700

**Badiani A, Berridge KC, Heilig M, Nutt DJ, Robinson TE.** Addiction research and theory: a commentary on the surgeon general's report on alcohol, drugs, and health. *Addiction Biology*. 2018; 23: 3–5

**Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG.** An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in Lipid Research*. 2010; 49: 378–389

**Bagatolli LA, Mouritsen OG.** Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Frontiers in Plant Science*. 2013; 457: 1-6

**Bastian M, Heymann S, Jacomy M.** Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. *International AAAI Conference on weblogs and social media*, 2009.

**Benett WFD, MacCallum JL, Hinner MJ, Marrink SJ, Tieleman DP.** Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membrane environments. *Journal of the American Chemical Society*. 2009; 131: 12714-12720

**Bennett WFD, Tieleman DP.** Computer simulations of lipid membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1828: 1765-1776

**Bennett WFD, Shea JF, Tieleman DP.** Phospholipid chain interactions with cholesterol drive domain formation in lipid membranes. *Biophysical Journal*. 2018; 114: 2595-2605



**Benjamin** R, Buenaventura R, Glaser SE. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*. 2008; 11: 105-120

**Blondel** VD, Guillaume JL, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2008: P10008

**Bockaert** J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Journal of the European Molecular Biology Organization*. 1999; 18: 1723–1729

**Cang** X, Du Y, Mao Y, Wang Y, Yang H, Jiang H. Mapping the functional binding sites of cholesterol in  $\beta_2$ -adrenergic receptor by long time molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*. 2013; 117: 1085-1094

**Chartoff** EH, Mavrikaki M. Sex differences in kappa opioid receptor function and their potential impact on addiction. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 9: 466

**Chattopadhyay** A. GPCRs: lipid-dependent membrane receptors that act as drug targets. *Advances in Biology*. 2014; article ID 143023

**Chavent** M, Duncan AL, Sansom MSP. Molecular dynamics simulations of membrane proteins and their interactions: from nanoscale to mesoscale. *Current Opinion in Structural Biology*. 2016; 40: 8-16

**Cherezov** V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 2008; 318: 1258-1265

**Clark** LD, Dikiy I, Chapman K, Rödström KEJ, Aramini J, LeVine MV, Kelashvili G, Rasmussen SGF, Gardner KH, Rosenbaum DM. Ligand modulation of sidechain dynamics in a wild type human GPCR. *eLife*. 2017; 6: e28505

**Cong** X, Campomanes P, Kless A, Schapitz I, Wagener M, Koch T, Carloni P. Structural determinants for the binding of morphinan agonists to the  $\mu$ -opioid

receptor. PloS One. 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0135998

**Cordomí A**, Perez JJ. Molecular dynamics simulations of rhodopsin in different one-component lipid bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007; 111: 7052-7063

**Corradi V**, Mendez-Villuendas E, Ingólfsson HI, Gu RX, Siuda I, Melo MN, Moussatova A, DeGagné LJ, Sejdiu BI, Singh G, Wassenaar TA, Magnero KD, Marrink SJ, Tieleman DP. Lipid-protein interactions are unique fingerprints for membrane proteins. *ACS Central Science*. 2018. 4: 709-717.

**Corradi V**, Sejdiu BI, Mesa-Galoso H, Abdizadeh H, Noskov SY, Marrink SJ, Tieleman DP. Emerging diversity in lipid-protein interactions. *Chemical Reviews*. 2019; 119: 5775-5848

**Crozier PS**, Stevens MJ, Forrest LR, Woolf TB. Molecular dynamics simulation of dark-adapted rhodopsin in an explicit membrane bilayer: coupling between local retinal and larger scale conformational change. *Journal of Molecular Biology*. 2003; 333: 493-514

**Cui X**, Yeliseev A, Liu R. Ligand interaction, binding site and G protein activation of the mu opioid receptor. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 702: 309-315

**Dahl ACE**, Chavent M, Sansom MSP, Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction, *Bioinformatics*, 2012, 16: 2193-2194

**Deekonda S**, Wugalter L, Rankin D, Largent-Milnes T, Davis P, Wang Y, Bassirirad NM, Lai J, Kulkarni V, Canderah TW, Porreca F, Hruby VJ. Design and synthesis of novel bivalent ligands (MOR and DOR) by conjugation of enkephalin analogues with 4-anilidopiperidine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016; 25: 4683-4688

**de Jong DH**, Periolo X, Marrink SJ. Dimerization of amino acid side chains: lessons from the comparison of different force fields. *Journal of Chemical Theory Computation*. 2012; 8: 1003-1014

**de Meyer F, Smit B.** Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009; 106: 3654-3658

**Desai A, Miller LJ.** Sensitivity of cholecystinin receptors to membrane cholesterol content. *Frontiers in Endocrinology.* 2012; 3

**Doré AS, Okrasa K, Patel JC, Serrano-Vega M, Bennett K, Cooke RM, Errey JC, Jazayeri A, Khan S, Tehan B, Weir M, Wiggin GR, Marshall FH.** Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature.* 2014; 511: 557-562

**Elgeti M, Rose AS, Bartl FJ, Hildebrand PW, Hofmann KP, Heck M.** Precision vs flexibility in GPCR signaling. *Journal of the American Chemical Society.* 2013; 135: 12305-12312

**Engelman DM.** Membranes are more mosaic than fluid. *Nature.* 2005; 438: 578-580

**Epand RM.** Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochimica Biophysica Acta.* 2008; 1778: 1576-1582

**Erbs E, Faget L, Veinante P, Kieffer BL, Massotte D.** In vivo neuronal co-expression of mu and delta opioid receptors uncovers new therapeutic perspectives. *Receptors & Clinical Investigation.* 2014; Doi: 10.14800/rci.210

**Escribá PV, González-Roz JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquest X, Horváth I, Barceló-Coblijn G.** Membranes: a meeting points for lipids, proteins and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2008; 12: 829-875

**Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S.** Lipid classification, structures and tools. *Biochimica Biophysica Acta.* 2011; 1811: 637-647

**Fanelli F, De Benedetti PG.** Update 1 of: Computational modeling approaches to structure function analysis of G protein-coupled receptors. *Chemical Reviews.*

2011; 111: 438-535

**Fantini J**, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4: 31

**Fantini J**, Di Scala C, Baier CJ, Barrantes FJ. Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016; 199: 52-60

**Farran B**. An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Journal of Pharmacology Research*. 2017; 117: 303-327

**Feller SE**, Gawrisch K, Woolf TB. Rhodopsin exhibits a preference for solvation by polyunsaturated docosohexaenoic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 2003; 125: 4434-4435

**Feng Y**, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus L, Xia Y. Current research on opioid receptor function. *Current Drug Targets*. 2012; 13: 230-246

**Ferré S**, Casadó V, Devi LA, Filizola M, Jockers R, Lohse M, Milligan G, Pin JP, Guitart X. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological Reviews*. 2014; 66: 413-434

**Fields HL**, Margolis EB. Understanding opioid reward. *Trends in Neurosciences*. 2015; 38: 217-225

**Filizola M**. Increasingly accurate dynamic molecular models of G-protein coupled receptor oligomers: Panacea or Pandora's box for novel drug discovery? *Life Sciences*. 2011; 86: 590-597

**Fossépré M**, Leherte L, Laaksonen A, Vercauteren DP. On the modularity of the intrinsic flexibility of the  $\mu$  opioid receptor: a computational study, *PLoS ONE*, 2014, 9: e115856.

**Gahbauer S**, Böckmann RA. Membrane-mediated oligomerization of G protein

coupled receptors and its implications for GPCR function. *Frontiers in Physiology*. 2016. Doi: 10.3389/fphys.2016.00494

**Gaibelet G**, Millot C, Lebrun C, Ravault S, Saulière A, André A, Lagane B, Lopez A. Cholesterol content drives distinct pharmacological behaviours of micro-opioid receptor in different microdomains of the CHO plasma membrane. *Molecular Membrane Biology*. 2008; 25: 423-35

**Gaitonde SA**, González-Maeso J. Contribution of heteromerization to G protein-coupled receptor function. *Current Opinion in Pharmacology*. 2017; 32: 23-31

**Gerlier D**, Alais S, Chazal N. Les radeaux membranaires : des plates-formes de choix pour l'entrée, l'assemblage ou le bourgeonnement de virus. *Virologie*. 2004; 8: 194-214

**Gershengorn MC**, Osman R. Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology*. 2001; 142: 1-10

**Gimpl G**. Interaction of G protein coupled receptors and cholesterol. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016; 199: 61-73

**Giri A**, Hruby VJ. Investigational peptide and peptidomimetic  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor agonists in the relief of pain. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2014; 23: 227-241

**Glykos NM**. Carma: a molecular dynamics analysis program. *Journal of Computational Chemistry*. 2006; 27: 1765-1768

**Gomes I**, Ayoub MA, Fujita W, Jaeger WC, Pflieger KDG, Devi LA. G protein-coupled receptor heteromers. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2016; 56: 403-415

**Goñi FM**. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1838: 1467-1476

**Granier S**, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK. Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature*. 2012; 485: 400-

**Grossfield** A, Feller SE, Pitman MC. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by  $\omega$ -3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 4888-4893

**Guo** D, Heitman LH, Ijzerman AP. Kinetic Aspects of the interaction between ligand and G protein-coupled receptor: the case of the adenosine receptors. *Chemical Reviews*. 2017; 117: 38-66

**Hakobayan** D, Heuer A. Key molecular requirements for raft formation in lipid/cholesterol membranes. *PLoS One*. 2014; doi:10.1371/journal.pone.0087369

**Harikumar** KG, Puri V, Singh RD, Hanada K, Pagano RE, Miller LJ. Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. 2005; 280: 2176-85

**Hollenstein** K, Kean J, Bortolato A, Cheng RKY, Doré AS, Jazaueri A, Cooke RM, Weir M, Marshall FH. Structure of class B GPCR corticotropin releasing factor receptor 1. *Nature*. 2013; 499: 438-443

**Huang** P, Xu W, Yoon SI, Chen C, Chong PLG, Unterwald EM, Lieu-Chen LY. Agonist treatment did not affect association of mu opioid receptors with lipid rafts and cholesterol reduction had opposite effects on the receptor-mediated signaling in rat brain and CHO cells. *Brain Research*. 2007; 1184: 46-56

**Huang** H, Simsek MF, Jin W, Pralle A. Effect of receptor dimerization on membrane lipid raft structure continuously quantified on single cells by camera based fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS One*. 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0121777

**Huang** J, Lakkaraju SK, Coop A, MacKerell AD. Conformational heterogeneity of intracellular loop 3 of the  $\mu$ -opioid G-protein coupled receptor. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2016; 120: 11897-11904

**Humphrey** W, Dalke A, Schulten K. VMD-Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996; 14: 33-38

**Huster** D. Solid-state NMR spectroscopy to study protein–lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1841: 1146-160

**Huynh** J, Thomas WG, Aguilar MI, Pattenden LK. Role of helix 8 in G protein-coupled receptors based on structure–function studies on the type 1 angiotensin receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 302: 118-127

**Ibrahim** S, McCartney A, Markosyan N, Smyth EM. Heterodimerization with the prostacyclin receptor triggers thromboxane receptor relocation to lipid rafts. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2013; 33: 60-66

**Jaakola** VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien YET, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC. The 2.6 Å crystal structure of a human A<sub>2A</sub> adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008; 322: 1211-1217

**Jacobson** KA. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochemical Pharmacology*. 2015; 9: 541-555

**Jacomy** M, Venturini T, Heymann S, Bastian M. ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. *PLoS One*. 2014. Doi:10.1371/journal.pone.0098679

**Jacoby** E, Bouhelal R, Gerspachet M, Seuwen K. The 7TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem Med Chem*. 2006; 1: 760-782

**Jardón-Valadez** E, Ulloa-Aguirre A, Piñeiro A. Modeling and molecular dynamics simulation of the human gonadotropin-releasing hormone receptor in a lipid bilayer. *Journal of Physical Chemistry B*. 2008; 112: 10704-10713

**Jo** S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 2009; 29: 1859-1865

**Johnston** JM, Filizola M. Differential stability of the crystallographic interfaces of mu- and kappa-opioid receptors. *PLoS One*. 2014.

Doi:10.1371/journal.pone.0090694

**Katira S**, Mandadapu KK, Vaikuntanathan S, Smit B, Chandler D. Pre-transition effects mediate forces of assembly between transmembrane proteins. *eLife*. 2016. Doi: 10.7554/eLife.13150

**Katritch V**, Cherezov V, Stevens RC. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012; 33: 17-27

**Kelashvili G**, Grossfield A, Feller SE, Pitman MC, Weinstein H. Structural and dynamic effects of cholesterol at preferred sites of interaction with rhodopsin identified from microsecond length molecular dynamics simulations. *Proteins*. 2009; 76: 403-417

**Kobilka BK**, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2007; 28: 397-406

**Kobilka B**, Schertler GFX. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008; 29: 79-83

**Lagane B**, Gaibelet G, Meilhoc E, Masson JM, Cézanne L, Lopez A. Role of sterols in modulating the human mu-opioid receptor function in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 33197-33200

**Laganowsky A**, Reading E, Allison TM, Ulmschneider MB, Degiacomi MT, Baldwin AJ, Robinson CV. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*. 2014; 510: 172-180

**Law PY**, Reggio PH, Loh HH. Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013; 38: 275-282

**Lee AG**. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1312: 1-40

**Lee AG**. Lipid-protein interactions. *Biochemical Society Transactions*. 2011; 39: 761-766

**Li H**, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in



cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*. 1998; 139: 4991-4997

**Lopez A**, Salomé L. Membrane functional organisation and dynamic of  $\mu$ -opioid receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009; 66: 2093-2108

**Lyman E**, Higgs C, Kim B, Lupyan D, Shelley JC, Farid R, Voth GA. A role for a specific cholesterol interaction in stabilizing the Apo configuration of the human A2A adenosine receptor. *Structure*. 2009; 17: 1660-1668

**MackKerell AD Jr**, Feig M, Brooks CL III. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 2004; 25: 1400-1415

**Madariaga-Mazón A**, Marmolejo-Valencia AF, Li Y, Toll L, Houghten RA, Martinez-Mayorga K. Mu-opioid receptor biased ligands: a safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discovery Today*. 2017; 22: 1719-1729

**Manglik A**, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, et al. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. 2012; 485: 321-327

**Mansour A**, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*. 1994; 350: 412-438

**Marino KA**, Prada-Garcia D, Provasi D, Filizola M. Impact of lipid composition and receptor conformation on the spatio-temporal organization of  $\mu$ -opioid receptors in a multi-component plasma membrane model. *PLoS Computational Biology*. 2016. Doi: 12:e1005240

**Marrink SJ**, de Vries AH, Mark AE. Coarse grained model for semiquantitative lipid simulations. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108: 750-760

**Marrink** SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse-grained model for biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007; 111: 7812-7824

**Marrink** SJ, Corradi V, Souza PCT, Ingólfsson HI, Tieleman DP, Sansom MSP. Computational modeling of realistic cell membranes. *Chemical Reviews*. 2019; 119: 6184-6226

**Mc Ewen** BS, Milner TA. Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *Journal of Neuroscience Research*. 2017; 95: 24–39

**Meng** XY, Mezei M, Cui M. Computational approaches for modeling GPCR dimerization. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2014; 15: 996-1006

**Merrill** AH, Dennis EA, McDonald JG, Fahy E. Lipidomics technologies at the end of the first decade and the beginning of the next. *American Society for Nutrition*. 2013; 4: 565-567

**Miao** Y, McCammon JA. G-protein coupled receptors: advances in simulation and drug discovery. *Current Opinion in Structural Biology*. 2016; 41: 83-89

**Minh Duc** N, Kim HR, Chung KY. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 763: 214-222

**Mondal** S, Johnston JM, Wang H, Khelashvili G, Filizola M, Weinstein H. Membrane driven spatial organization of GPCRs. *Scientific Reports*. 2013. Doi: 10.1038/srep02909

**Monticelli** L, Kandasamy SK, Periole X, Larson RG, Tieleman DP, Marrink SJ. The MARTINI coarse-grained force field: extension to proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008; 4: 819-834

**Muller** MP, Jiang T, Sun C, Lihan M, Pant S, Mahinthichaichan P, Trifan A, Tajkhorshid E. Characterization of lipid-protein interactions and lipid-mediated modulation of membrane protein function through molecular simulation. *Chemical Reviews*. 2019; 119: 6086-6161

**Muro** E, Atilla-Gokcumen GE, Eggert US. Lipids in cell biology: how can we understand them better? *The American Society for cell Biology*. 2014; 25: 1819-1823

**Nagle** JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1469: 159-195

**Narita** M, Funada M, Suzuki T. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology & Therapeutics*. 2001; 89: 1-15

**Nicolson** GL. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1838: 1451-1466

**Olausson** BES, Grossfield A, Pitman MC, Brown MF, Feller SE, Vogel A. Molecular dynamics simulations reveal specific interactions of post-translational palmitoyl modifications with rhodopsin in membranes. 2012; 134: 4324-4331

**Olson** KM, Lei W, Keresztes A, LaVigne J, Streicher JM. Novel molecular strategies and targets for opioid drug discovery for the treatment of chronic pain. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2017; 90: 97-110

**Paila** YD, Chattopadhyay A. The function of G-protein coupled receptors and membrane cholesterol: specific or general interaction? *Glycoconj Journal*. 2009; 26: 711-720

**Palsdottir** H, Hunte C. Lipids in membrane protein structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1666: 2-18

**Pang** L, Graziano M, Wang S. Membrane cholesterol modulates galanin-GalR2 interaction. *Biochemistry*. 1999; 38: 12003-12011

**Park** JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe HW, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 2008; 454: 183-187

**Pasternark** GW. Molecular insights into  $\mu$  opioid pharmacology: from the clinic to the bench. *The Clinical Journal of Pain*. 2010. Doi:10.1097/AJP.0b013e3181c49d2e

**Périole X**, Cavalli M, Marrink SJ, Ceruso MA. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: structure, dynamics, and intermolecular recognition. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2009; 5: 2531-2543

**Periole X**, Knepp AM, Sakmar TP, Marrink SJ, Huber T. Structural determinants of the supramolecular organization of G protein-coupled receptors in bilayers. *Journal of the American Chemical Society*. 2012; 134: 10959-10965

**Phillips JC**, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 2005; 26: 1781-1802

**Pitman MC**, Grossfield A, Suits F, Feller SE. Role of cholesterol and polyunsaturated chains in lipid-protein interactions: molecular dynamics simulation of rhodopsin in a realistic membrane environment. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127:4576-4577

**Pluhackova K**, Gahbauer S, Kranz F, Wassenaar TA, Böckmann RA. Dynamic cholesterol-conditioned dimerization of the G protein coupled chemokine receptor type 4. *PLoS Computational Biology*. 2016. Doi: e1005169

**Pogozheva I**, Mosberg HI, Lomize AL. Life at the border: Adaptation of proteins to anisotropic membrane environment. *Protein Science*. 2014; 23: 1165-1196

**Poma AB**, Cieplak M, Theodorakis PE. Combining the MARTINI and structure-based coarse-grained approaches for the molecular dynamics studies of conformational transitions in proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2017; 13: 1366-1374.

**Pontier SM**, Percherancier Y, Galandrin S, Breit A, Galés C, Bouvier M. Cholesterol-dependent separation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 24659-24672

**Prasanna X**, Chattopadhyay A, Sengupta D. Cholesterol modulates the dimer

interface of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor via cholesterol occupancy sites. *Biophysical Journal*. 2014; 106: 1290-1300

**Prasanna** X, Sengupta D, Chattopadhyay A. Cholesterol-dependent conformational plasticity in GPCR dimers. *Nature*. 2016. Doi: 10.1038/srep31858

**Provasi** D, Boz MB, Johnston JM, Filizola M. Preferred supramolecular organization and dimer interfaces of opioid receptors from simulated self-association. *PLoS Computational Biology*. 2015. Doi:10.1371/journal.pcbi.1004148

**Przewlocki** R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 429: 79-91

**Pucadyil** TJ, Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Progress in Lipid Research*. 2006; 45: 295-333

**Rasmussen** SGF, De Vree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor–Gs protein complex. *Nature*. 2011; 477: 549-555

**Sadiq** SK, Guixà-González R, Dainese E, Pastor M, De Fabritiis G, Selent J. Molecular modeling and simulation of membrane lipid-mediated effects on GPCRs. *Current Medicinal Chemistry*. 2013; 20: 22-38

**Sali** A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. 1993; 234:779-815

**Saulière-Nzeh** AN, Millot C, Corbani M, Mazères S, Lopez A, Salomé L. Agonist-selective dynamic compartmentalization of human mu opioid receptor as revealed by resolutive FRAP analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 14514-14520

**Sengupta** D, Chattopadhyay A. Identification of cholesterol binding sites in the

serotonin 1A receptor. *Journal of Physical Chemistry*. 2012; 116: 12991-12996

**Shan** J, Kelashvili G, Mondal S, Mehler EL, Weinstein H. Ligand-dependent conformations and dynamics of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor determine its activation and membrane-driven oligomerization properties. *PLoS Computational Biology*. 2012. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1002473

**Shang** Y, Filizola M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *European Journal of Pharmacology*. 2015; 763: 206-213

**Shim** JY. Transmembrane helical domain of the cannabinoid CB1 receptor. *Biophysical Journal*. 2009; 96: 3251-3262

**Shim** J, Coop A, MacKerell AD Jr. Molecular details of the activation of the  $\mu$  opioid receptor. *Journal of Physical Chemistry B*. 2013; 117: 7907-7917

**Singer** SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; 175:720-31

**Siuda** ER, Carr R III, Rominger DH, Violin JD. Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*. 2017; 32: 77-84

**Sjögren** B, Svenningson P. Depletion of the lipid raft constituents, sphingomyelin and ganglioside, decreases serotonin binding at human 5-HT<sub>7(a)</sub> receptors in HeLa cells. *Acta Physiologica*. 2007; 190: 47-53

**Stevens** RC, Cherezov V, Katritch V, Abagyan R, Kuhn P, Rosen H, Wüthrich K. The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nature Review Drug Discovery*. 2013; 12: 25-34

**Stockton** SD, Devi LA. Functional relevance of  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heteromerization: A Role in novel signaling and implications for the treatment of addiction disorders: From a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. *Drug and Alcohol Dependence*. 2012; 121: 167-172

**Sud M**, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Subramaniam S. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35: 527-532

**Thompson AA**, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E, Huang XP, Trapella C, Guerrini R, Calo G, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*. 2012; 485: 395-399

**Topiol S**, Sabio M. X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochemical Pharmacology*. 2009; 78: 11-20

**Trang T**, Al-Hasani R, Salvemini D, Salter MW, Gutstein H, Cahill CM. Pain and poppies: the good, the bad, and the ugly of opioid analgesics. *The Journal of Neuroscience*. 2015; 35: 13879-13888

**van Meer G**, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008; 9: 112-124

**van Meer G**, de Kroon AIPM. Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*. 2011; 124: 5-8

**Vardanyan RS**, Cain JP, Haghighi SM, Kumirov VK, McIntosh MI, Sandweiss AJ, Porreca F, Hruby VJ. Synthesis and investigation of mixed  $\mu$ -opioid and  $\delta$ -opioid agonists as possible bivalent ligands for treatment of pain. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2017; 54: 1228-1235

**Wacker D**, Wang C, Katritch V, Han GW, Huand XP, Vardy E, McCorvy JD, Jiang Y, Chu M, Siu FY, Liu W, Xu HE, Cherezov V, Roth BL, Stevens RC. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*. 2013; 340: 615-619

**Waldhoer M**, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry*. 2004; 73: 953-990

**Wang C**, Wu H, Katritch V, Han GW, Huand XP, Liu W, Siu FY, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human smoothened receptor 7TM bound to an

antitumor agent. *Nature*. 2013; 497: 338-343

**Williams** JT, Ingram SL, Henderson G, Chavkin C, von Zastrow M, Schulz S, Koch T, Evans CJ, Christie MJ. Regulation of  $\mu$ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological Reviews*. 2013; 65: 223-254

**Wu** B, Chien YET, Mol CG, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. Structures of the CXCR4 chemokine receptor in complex with small molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 2010; 19: 1066-1071

**Wu** H, Wacker D, Katritch C, Mileni M, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang XP, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human kappa opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*. 2012; 485: 327-332

**Wu** H, Wang C, Gregory KJ, Han GW, Cho HP, Xia Y, Niswender CM, Katritch V, Meiler J, Cherezov V, Conn PJ, Stevens RC. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*. 2014; 344: 58-64

**Xu** W, Yoon SI, Huang P, Wang Y, Chen C, Chong PLG, Liu-Chen LY. Localization of the  $\kappa$  opioid receptor in lipid rafts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006; 317: 1295-1306

**Yeagle** PL, Albert AD. G-protein coupled receptor structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1768: 808-824

**Yin** J, Mobarec JC, Kolb P, Rosenbaum DM. Crystal structure of the human OX<sub>2</sub> orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature*. 2015; 519: 247-250

**Zhang** K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, Moss SM, Paoletta S, Kiselev E, Lu W, Fenalti G, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V,



Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q. Structure of the human P2Y<sub>12</sub> receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*. 2014; 509: 115-118

**Zhang** D, Zhao Q, Wu B. Structural studies of G protein-coupled receptors. *Molecules and Cells*. 2015; 38: 836-842

**Zheng** H, Chu J, Qiu Y, Loh HH, Law PY. Agonist-selective signaling is determined by the receptor location within the membrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 8: 9421-9426

**Zheng** H, Pearall EA, Hurst DP, Zhang Y, Chu J, Zhou Y, Reggio PH, Loh HH, Law PY. Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize  $\mu$ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biology*. 2012. Doi: 10.1186/1471-2121-13-6