Récepteurs gustatifs humains : étude des relations structure-fonction

Christine Belloir

▶ **To cite this version:**

Christine Belloir. Récepteurs gustatifs humains : étude des relations structure-fonction. Biologie moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK064 . tel-03506994

HAL Id: tel-03506994
https://theses.hal.science/tel-03506994

Submitted on 3 Jan 2022

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

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

Université de Bourgogne Franche-Comté

Ecole Doctorale Environnement-Santé n°554

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté,

F-21000 Dijon, France.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Bourgogne Franche-Comté

Discipline : Sciences de la Vie

Présentée par **Christine BELLOIR**

Récepteurs gustatifs humains : étude des relations structure-fonction

Thèse présentée et soutenue à DIJON,

le 17 décembre 2019

Composition du jury

G. Guiraudie-Capraz	Maître de conférences, Université Aix	Rapporteur
A. Marchal	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Rapporteur
P. Degrace	Professeur, Université Bourgogne-Franche-Comté	Examinateur
J. Golebiowski	Professeur, Université de Nice Sophia-Antipolis	Examinateur
L. Briand	Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique	Directeur de thèse
F. Neiers	Maître de conférences, Université Bourgogne-Franche-Comté	Co-encadrant de thèse

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE AU CENTRE DES SCIENCES DU GOÛT ET DE L'ALIMENTATION

Ecole doctorale n°554

« Environnements-Santé »

Doctorat de Sciences de la Vie, Biochimie Biologie Moléculaire

Par

Christine BELLOIR

Récepteurs gustatifs humains : étude des relations structure-fonction

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 17 décembre 2019

Composition du Jury :

G. Guiraudie-Capraz	Maître de conférences, Université Aix	Rapporteur
A. Marchal	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Rapporteur
P. Degrace	Professeur, Université Bourgogne-Franche-Comté	Examinateur
J. Golebiowski	Professeur, Université de Nice Sophia-Antipolis	Examinateur
L. Briand	Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique	Directeur de thèse
F. Neiers	Maître de conférences, Université Bourgogne-Franche-Comté	Co-encadrant de thèse

Jacques Rouxel

S'il n'y a pas de solution c'est qu'il n'y a pas de problèmes.

En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche

Remerciements

La thèse de doctorat représente un moment particulier dans la vie d'un chercheur, le parcours pour en arriver là ne suit pas toujours la logique académique de l'étudiant modèle. Pour ma part, je ne regrette en rien le chemin parcouru depuis mon arrivée, BTS de Biochimie en poche, en tant qu'assistante ingénieure dans le monde de la recherche, il y a déjà 26 ans.

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, Loïc Briand, mais bien plus en réalité car aussi mon responsable direct. Merci pour avoir cru en mes capacités. Il m'aura fallu 8 ans pour me décider, et finalement, la frustration des concours internes et la colère m'auront fait franchir le pas de la thèse en une soirée, alors merci pour ta persévérance. Je te remercie également pour ta confiance au quotidien, pour m'avoir impliquée dans différents projets tous aussi excitants les uns que les autres qui sont finis, en cours, ou nous attendent dans les années à venir. Merci pour ton écoute, ton enthousiasme et pour cette qualité rare pour un chef de dire que nous faisons du bon travail. Enfin merci, de m'avoir fait voyager au gré des congrès internationaux qui m'ont fait comprendre toute l'importance du réseau de connaissances pour construire des collaborations et monter des projets.

Mes remerciements chaleureux vont aussi à Fabrice Neiers, mon co-directeur de thèse. Merci pour nos discussions et tes conseils avisés sur l'évolution et l'organisation de ce travail de thèse. Merci pour ta relecture scrupuleuse du manuscrit et tes remarques avisées qui m'ont permis de clarifier ma pensée parfois embrouillée. Je reconnais en toi toutes les qualités pédagogiques du Maître de conférences. Cette année est aussi la tienne avec l'obtention de ton HDR et je suis fière que ce co-encadrement ait participé un peu à cette réalisation. Merci pour ton énergie et ta bonne humeur qui sont de puissants stimulants intellectuels. N'oublie pas les conseils de Jean-Pierre Changeux, viser plus haut que plus large pour tes projections à long terme.

Je remercie Madame Gaëlle Guiraudie-Capraz et Monsieur Axel Marchal qui ont acceptés d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Monsieur Pascal Degrace, et Monsieur Jérôme Golebiowski pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. J'espère que vous ne m'en voudrez pas trop de vous avoir imposer une introduction assez longue. Mon objectif était aussi d'en faire par la suite un outil utile à nos futurs stagiaires.

Je tiens à remercier Monsieur Frédéric Lirussi et Monsieur Arnaud Hecker pour leur participation annuelle à mon comité de suivi de thèse. Leurs conseils et leur regard extérieur ont permis de faire évoluer au mieux les différents aspects de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Prof Wolfgang Meyerhof pour m'avoir accueillie pendant trois semaines au Dife Institut à Nuthetal près de Postdam. Merci à Anne Brockhoff pour son expertise avisée. Merci à Natacha Roudnitsky qui a encadré mes expériences et m'a fait partager les usages et détails techniques en vigueur au Dife, qui font la qualité de leurs données depuis de nombreuses années.

Enfin je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés pour mes recherches m'ont permis d'avancer dans cette phase délicate de l'apprenti-chercheur.

J'ai une pensée toute particulière pour les quatre stagiaires qui ont participé à mes recherches et validé leur diplôme. Merci à Ségolène Hlasny en stage de Master BioSciences et Ingénierie de la Santé (Université de Nancy) qui a travaillé sur le récepteur umami. Merci à mes deux « bébé INRA » : Lucie Tornier qui a commencé en apprentissage lors de son BTS Anabiotec et qui a poursuivi sa formation à mes côtés en apprentissage dans la licence professionnelle « Culture de tissus et cellules et biologie moléculaire » (CTCBM) ; Marine Brulé, ancienne apprentie en BTS Anabiotec qui a bien voulu reprendre ces études en intégrant la licence CTCBM, pour travailler à nouveau avec moi et continuer les travaux initiés avec Lucie sur la production du récepteur au sucré en cellules HEK. En tant que maître d'apprentissage, j'ai été ravie de vous encadrer et c'est un plaisir de vous avoir vu évoluer au fil des ans, autant en science que sur le plan personnel. Merci aussi à Adèle Gauthier, stagiaire en DUT Génie biologique à Dijon, pour son travail sur nos constructions du récepteur à l'amer.

Je remercie plus particulièrement mes collègues les plus proches qui ont participé de près ou de loin à cette aventure. Nicolas Poirier pour son implication dans les expériences de repliement des protéines et les longues heures passées sur le spectrofluorimètre, Lucie Moitrier pour son investissement sur l'expression en SUMO de nos protéines, et Franck Ménétrier pour avoir relu ce manuscrit à la recherche des fautes et assurer mon hydratation en préparant la tisane.

Je n'oublie pas mes autres « canetons » qui me suivent quotidiennement en culture cellulaire : Thomas Délompré en thèse CIFRE sur les récepteurs à l'amer (ton tour approche, plus qu'un an pour rédiger) et Mathilde Jeannin en CDI sur nos contrats industriels et projet européen (merci pour ta rigueur et ton soutien logistique sans faille au quotidien).

Merci aussi à mes autres collègues dont Patrick et Laurence de l'animalerie, mais aussi Marie-Chantal, Margot Evelyne, Margot, Karen, Rémi, Véronique et bien d'autres, pour les pauses café et moments de détente partagés le matin dans la joie et la bonne humeur.

Du fond du cœur, je remercie ma sœur Isabelle et ma maman pour leurs encouragements pendant ces trois ans, dommage que papa ne soit plus là pour voir ça, il aurait adoré. Merci à mes beaux-parents dont Yvette pour sa relecture même si elle n'a pas tout compris. Merci à mon mari Thierry pour avoir attendu tous les soirs que j'aille dormir, en dormant lui-même sur le canapé devant la télé. Enfin merci à mes filles Faustine et Lison pour avoir assuré en partie l'intendance à la maison et pour leur scolarité exemplaire qui m'aura enlevé cette part de tracas pendant ces derniers mois. J'espère que la réalisation de cette thèse et les efforts que vous m'avez vu fournir vous donnerons l'envie et la ténacité nécessaires pour atteindre vos objectifs. Puissiez-vous dans l'avenir qui s'ouvre à vous, trouver autant de satisfaction dans votre futur métier que j'en ai avec le mien.

Résumé

Les détecteurs gustatifs aux saveurs sucrées, umami et amères sont des récepteurs membranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont caractérisés par l'existence d'un domaine transmembranaire (DTM) hydrophobe et un mécanisme d'activation qui implique une protéine G hétérotrimérique.

L'homme possède 25 récepteurs à l'amer TAS2R. Ces récepteurs appartiennent à la classe A des RCPG. Leur architecture est constituée d'un DTM structuré en 7 hélices α qui forment le site orthostérique de liaison des molécules amères. Le récepteur au goût umami est un hétérodimère composé des sous-unités TAS1R1 et TAS1R3, alors que les sous-unités TAS1R2 et TAS1R3 s'assemblent pour composer le récepteur au goût sucré. Chacune de ces sous-unités appartient à la classe C des RCPG et partage une architecture commune, constituée d'un domaine N-terminal (DNT) extracellulaire de grande taille qui est relié au DTM par une région riche en cystéine (RRC). La contribution de chaque sous-unité au fonctionnement des récepteurs hétérodimériques demeure cependant largement inconnue.

A cause de leur nature amphipathique, les RCPG constituent une famille de protéines extrêmement difficiles à étudier d'un point de vue biochimique. Caractériser leurs interactions et déterminer leurs structures sont des enjeux importants et un véritable challenge pour les années à venir. Dans ce travail, nous avons développé différents systèmes d'expression afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent les interactions récepteur-ligand.

Pour l'étude du goût umami, les DNT de TAS1R1 et TAS1R3 ont été produits en bactérie *E. coli* sous forme de corps d'inclusions puis repliés *in vitro*. En combinant des approches biochimiques et des tests cellulaires d'activité fonctionnelle, nous avons montré que l'inosine-5'-monophosphate (IMP), un exhausteur du goût umami, se lie à TAS1R3-DNT et agit en synergie avec le sucralose et le néotame sur l'activation du récepteur TAS1R2/TAS1R3.

Concernant le récepteur au goût sucré, la sous-unité entière de TAS1R2 a été surexprimée dans une lignée cellulaire HEK293S inductible par la tétracycline. Un protocole de solubilisation et de purification a permis d'obtenir le récepteur TAS1R2 fonctionnel. Une analyse par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain a révélé que TAS1R2 est bien replié. La diffusion de lumière couplée à la gel filtration a montré que TAS1R2 était présent majoritairement sous forme dimérique. Les interactions avec les ligands sucrés mesurées par fluorescence intrinsèque ont révélé des affinités de l'ordre du micromolaire en accord avec les tests d'activités cellulaires et les pouvoirs sucrants des molécules.

Parallèlement, afin d'étudier les récepteurs au goût amer, nous avons conçu différents vecteurs d'expression du récepteur TAS2R14 afin d'améliorer son expression et son adressage à la membrane plasmique. Nous avons montré que l'utilisation de la séquence QBI SP163 en amont du codon initiateur de traduction, associée au peptide signal de la somatostatine 3 de rat en position N-terminale et à l'étiquette FLAG en position C-terminale, permettait d'augmenter la réponse fonctionnelle du récepteur aux ligands amers aussi bien en termes d'amplitude que de sensibilité. Cette construction plasmidique représente un outil prometteur pour aider à identifier certains agonistes des TAS2R orphelins.

Abstract

Sweet, umami and bitter taste detectors are membrane receptors that belong to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs). They are characterized by the existence of a hydrophobic transmembrane domain (TMD) and an activation mechanism that involves a heterotrimeric G protein.

Human possesses 25 bitter taste receptors named TAS2R. These receptors belong to class A GPCRs. Their architecture consists of a TMD structured in 7 α-helix which form the orthosteric binding site of bitter molecules. The umami taste receptor is a heterodimer composed of the TAS1R1 and TAS1R3 subunits, while the TAS1R2 and TAS1R3 subunits assemble to form the sweet taste receptor. Each subunit belongs to the class C GPCRs and shares a common architecture, consisting of a large extracellular N-terminal domain (NTD) connected to the TMD by a cysteine-rich region (CRR). However, the relative contribution of each subunit to the heterodimeric receptors function remains largely unknown.

Because of their amphipathic features, GPCRs are extremely difficult to study from a biochemical point of view. Characterizing their interactions and determining their structures are important issues and a real challenge for the next years. In this work, we have developed different expression systems to understand molecular mechanisms that govern receptor-ligand interactions.

For the study of umami taste, the TAS1R1 and TAS1R3 NTDs were produced in *E. coli* bacteria as inclusion bodies and then folded *in vitro*. By combining biochemical approaches and functional cellular assays, we have shown that inosine-5'-monophosphate (IMP), an umami flavor enhancer, binds to TAS1R3-NTD and enhance sweet taste detection of sucralose and neotame.

Regarding the sweet taste receptor, the subunit (full length) of TAS1R2 was overexpressed in a tetracycline inducible cell line HEK293S. Solubilization and purification protocol allows to obtain functional TAS1R2 receptor. Far-UV circular dichroism spectroscopy analysis revealed that TAS1R2 is folded. Multiangle light scattering coupled with gel filtration showed that TAS1R2 was predominantly present in dimeric form. Interactions with sweeteners measured by intrinsic fluorescence revealed micromolar range affinities in agreement with cellular assays and the sweetness potency of molecules.

In parallel, to study bitter receptors, we designed different TAS2R14 receptor expression vectors in order to improve receptor expression and targeting to the plasma membrane. We showed that use of the QBI SP163 sequence upstream of the translational initiation codon, associated with the signal peptide of the rat somatostatin 3 in the N-terminal position and the FLAG tag in the C-terminus position, increase the functional response of the receptor to bitter molecules both in terms of amplitude and sensitivity. This plasmid construct represents a promising tool to help identify some orphan TAS2R agonists.

Sommaire

Remerciements ..... **i**
Résumé ..... **iii**
Abstract ..... **iv**
Sommaire ..... **v**
Liste des figures ..... **vii**
Liste des abréviations ..... **viii**

Introduction et objectifs **1**

Partie 1 : Etat de l'art **7**

I. Qu'est-ce que le goût ? *11*
I.1. Le goût et les saveurs primaires 11
I.2. Les goûts salé et acide 13
I.3. Diversité des molécules sucrées 14
Article 1 : Sweeteners and sweetness enhancers *14*
I.4. La saveur umami 22
I.5. La saveur amère 24
I.6. Vers de nouveaux goûts 26
I.6.1. Le goût du gras 27
I.6.2. Le goût du calcium 27
I.6.3. La saveur kokumi 28
I.7. Perception trigéminale (astringence, frais et épicé) 29

II. Anatomie du système gustatif périphérique *30*
II.1. La langue, les papilles gustatives 30
II.2. Les bourgeons du goût 31
II.3. Les cellules gustatives 32
II.4. Neurotransmetteurs 35
II.5. Nerfs gustatifs 36
II.6. Le codage de l'information gustative 37

III. Les récepteurs du goût *39*
III.1. Les détecteurs au salé et à l'acide 39
III.1.1. Salé 39
III.1.2. L'acide 41
III.2. Les récepteurs TAS1Rs 42
III.2.1. Structure des RCPG de classe C 43
III.2.2. Propriétés de liaison du récepteur au goût sucré TAS1R2/TAS1R3 49
III.2.2.1. Rôle des domaines N-terminaux : hT1R2-DNT 49
III.2.2.2. Rôle des domaines N-terminaux : hTAS1R3-DNT 52
III.2.2.3. Implication des domaines transmembranaires 52
III.2.2.4. Fonction de la région riche en cystéine 53
III.2.3. Propriétés de liaison du récepteur au goût umami TAS1R1/TAS1R3 55
III.2.3.1. Rôle des domaines N-terminaux 55
III.2.3.2. Implication des domaines transmembranaires 58
III.3. Les récepteurs à l'amertume TAS2R 59
III.3.1. Structure des TAS2R 59
III.3.2. Propriétés de liaison des récepteurs au goût amer TAS2R 63
III.4. Mécanisme de transduction du goût 69
III.4.1. Mécanismes généraux d'activation des RCPG de classe A 69
III.4.2. Mécanismes généraux d'activation des RCPG de classe C 71

III.5. Distribution tissulaire des récepteurs du goût 76
III.6. Différences d'expression et polymorphisme des récepteurs 80

IV. Approches expérimentales et méthodes d'études in vitro des récepteurs gustatifs 83
IV.1. Expression et purification des RCPG 84
IV.1.1. Stratégie de surexpression des RCPG : différents systèmes d'expression 85
IV.1.1.1. Expression et production en bactéries Escherichia coli 85
IV.1.1.2. Expression et production chez la levure 87
IV.1.1.3. Expression et production dans les cellules d'insectes 88
IV.1.1.4. Système d'expression en cellules Eucaryotes 90
IV.1.1.1. Système d'expression acellulaire in vitro 91
IV.1.2. Solubilisation et purification des RCPG 92
IV.1.2.1. Importance du choix du détergent : 92
IV.1.2.1. Fragilité des RCPG et systèmes de stabilisation in vitro 95
IV.1.2.2. Purification par chromatographie 97
IV.1.2.3. Caractérisations biophysiques des GPCR purifiés 102
IV.1.2.4. Caractérisation fonctionnelle de l'activité des GPCR 104
IV.2. Expression fonctionnelle des RCPG en cellules vivantes 105
IV.2.1. Les lignées cellulaires 106
IV.2.2. Les protéines G et les facteurs accessoires 108
IV.2.3. Mobilisation du calcium intracellulaire 110

Partie 2 : Méthodologies, résultats, discussions 115

I. Article 2 : 117
Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli. 117
II. Article 3 : 137
The 5'-ribonucleotide IMP interacts with the human TAS1R3 sweet taste subunit to enhance sweet taste detection. 137
III. Article 4 : 165
Biophysical and functional characterization of the human TAS1R2 sweet taste receptor expressed in HEK293S inducible cell line. 165
IV. Article 5 : 187
Improving human TAS2R14 functional activation in heterologous cell based assays. 187

Partie 3 : Conclusion et perspectives 209

I. Etat de l'art au début de ma thèse de doctorat 211
II. Etude de DNT de TAS1R1 et TAS1R3 produits en E. coli 213
II.1. Travaux accomplis 213
II.2. Perspectives 215
III. Production de la sous-unité TAS1R2 en HEK293 216
III.1. Travaux accomplis 216
III.2. Perspectives 218
IV. Etude du récepteur à l'amer TAS2R14 219
IV.1. Travaux accomplis 219
IV.2. Perspectives 220
V. Intérêt et limites des différentes approches d'études des récepteurs gustatifs, que choisir ?.. 222

Références bibliographiques 226
Annexes 245
Liste des travaux scientifiques 258

Liste des figures

Figure 1 : Illustration simplifiée des 5 saveurs primaires ou fondamentales. 12
Figure 2 : Anatomie du système gustatif périphérique. 31
Figure 3 : Organisation d'un bourgeon du goût. 32
Figure 4 : Les principaux types de cellules gustatives. 33
Figure 5 : Neuroanatomie du système gustatif. 36
Figure 6 : Modèle de codage combinatoire de l'information gustative. 38
Figure 7 : Structure du canal ionique ENaC humain résolue par cryo-EM. 40
Figure 8 : Structure du canal ionique Otop1 résolue par cryo-EM. 42
Figure 9 : Arbre phylogénétique des différents membres de la famille des GPCR de classe C. 43
Figure 10 : Représentation schématique de la structure génomique des récepteurs TAS1R. 44
Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs du goût GPCR de classe C. 45
Figure 12 : Comparaison des sites de fixation des ligands pour CaSR et mGluR1. 46
Figure 13 : Reconnaissance des acides aminés par Tas1r2a-DNT chez Medaka fish. 48
Figure 14 : Reconnaissance non-spécifiques des acides aminés par Tas1r3a-DNT chez Medaka fish. 49
Figure 15 : Modélisation de la liaison de l'aspartame dans le site orthostérique du récepteur au goût sucré. 50
Figure 16 : Modèle d'interaction du L-glutamate et de l'IMP avec le DNT de hTAS1R1. 56
Figure 17 : Deux déterminants distincts de la sélectivité en acides aminés dans TAS1R1. 57
Figure 18 : Emplacements et orientations chromosomiques des gènes TAS2R humains. 60
Figure 19 : Cartographie des résidus conservés sur les GPCR de classe A. 62
Figure 20 : Arbre phylogénétique des différents membres de la famille des TAS2R. 64
Figure 21 : Modélisation moléculaire dynamique de TAS2R46 en présence de strychnine. 66
Figure 22 : Voie de signalisation cellulaire des cellules réceptrices du goût de type II. 70
Figure 23 : Mécanismes moléculaires d'activation d'un homodimère et hétérodimère des RCPG de classe C. 72
Figure 24 : Modèle d'activation d'un RCPG de classe C. 73
Figure 25 : Cartes et modèles moléculaires de mGluR5 obtenus par cryo-microscopie électronique (cryo-EM). 74
Figure 26 : Réarrangements de l'interface des DTM après activation du récepteur mGluR5. 75
Figure 27 : Vues d'ensemble des images de cryo-EM de mGluR5. 75
Figure 28 : Distribution tissulaire des récepteurs du goût. 78
Figure 29 : Stratégie de surexpression des GPCR dans *Escherichia coli.* 86
Figure 30 : Schéma du mode d'induction par la tétracycline dans la lignée HEK293S GnTI- inductible 91
Figure 31 : Structure chimique de quelques détergents utilisés pour solubiliser les protéines membranaires. 93
Figure 32 : Structure chimique des amphipols (Apol). 96
Figure 33 : Illustration schématique de la chromatographie d'affinité chitine (A) et MBP. 100
Figure 34 : Schéma des différentes lignées cellulaires HEK293 et de leur dérivation / historique. 107

Liste des abréviations

A2AR : Récepteur à l'adénosine
AD5 : Adenovirus de type 5
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
Apol : Amphipol
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
β2ADR : Récepteur β2 adrénergique
BET : Bromure d'éthidium
BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA : Albumine de sérum bovin
CALHM1 : Calcium homeostasis modulator 1
CasR : Récepteur sensible au calcium
CBD : Chitin Binding Domain
CCK : Cholecystokinine
CD : Circular Dichroism
CD36 : Transporteur d'acides gras
CHO : Chinese Hamster Ovary
CI : Corps d'inclusion
CMC : Concentration Micellaire Critique
Cryo-EM : Cryo-microscopie électronique
CSC : Concentration de solubilisation critique
DAG : Diacylglycérol
DEC : Domaine extracellulaire
DDM : n-Dodécyl-β-D-maltoside
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
DNT : Domaine N-terminal
DO : Densité optique
DTM : Domaine transmembranaire
DTT : Dithiothréitol
ECL : Extracellular loop
EDTA : Acide éthylène diamine tetra-acétique
ENaC : Canal sodique de type épithélial
FC14 : Fos-choline 14
FFAR : Free fatty acid receptor
FRET : Transfert d'énergie par résonance en fluorescence
GABA : Acide γ-aminobutyrique
GFP : Green Fluorescent Protein
GLAST : Glutamate aspartate transporteur
GLP : Glucagon-like peptide
GMP : Guanosine monophosphate
GRK : GPCR kinase
GuCl : Chlorure de guanidine
GSH : Glutathion
GST : Glutathione S-transferase
5-HT : Serotonine
HEK : Human embryonic kidney
HIC : Hydrophobic Interaction Chromatography
HMQC : Heteronuclear Single /Multiple Quantum Correlation
HTRF : Homogeneous Time Resolved Fluorescence
HTS : High Throughput Screening
ICL : Intracellular loop
IEX : Ion Exchange Chromatography
IL-4 : Interleukine 4
IMP : Inosine monophosphate
IP1 : Inositol phosphate
IP3 : Inositol triphosphate
IP3R3 : Inositol triphosphate receptor 3
IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalacto-pyranoside
ITC : Calorimétrie de titration isothermique
KO : Knock Out
LB : Luria-Bertoni
LB1 et LB2 : lobe 1 et lobe des DNT
LDAO : N-Dimethylamine-N-Oxyde
LMNG : Lauryl-Maltose-Neopentyl-Glycol
LS : Light Scattering
MBP : Protéine de liaison au maltose
MSP : Membrane Scaffolding Protein
mGluR : Récepteur métabotropique du glutamate
MSG : Glutamate monosodique
NAM : Negative Allosteric Modulator
NCAM : Neural cell adhesion molecule
NFS : Noyau du faisceau solitaire
NHDC : Néohespéridine dihydrochalcone
NTS : Noyau du tractus solitaire
OG : Octyl-glucopyranoside
OR : Olfactive receptor
OTOP1 : Otopetrine protéine
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAM : Positive Allosteric Modulator
PDB : Protein data base
PDE : Phosphodiesterase
PIP2 : Phosphatidylinositol biphophosphate
PKD2L1 : Polycyctic kidney disease 2-like 1
PLCβ2 : Phospholipase-C β2
PMSF : Phenylmethansulfonyl fluoride
PROP : Propylthiouracyl
PRP : Protéine riche en proline
PTC : Phenylthiocarbomide
P2X : Récepteurs purinergiques

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
REEP1 : Receptor Expression Enhancing Protein
RI : Refractive Index
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RPC : Reverse Phase Chromatography
RRC : Région riche en cystéine
RTP1 : Receptor Transporting Protein
SAXS : Small Angle X-ray Scattering
SEC : Size Exclusion Chromatography
SEC-MALS : Size Exclusion Chromatography- Multi-Angle Light Scattering
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SMAs : Stryrene-Maleic Acid copolymers
SNP : Polymorphisme n'affectant qu'un seul nucléotide
SNPA25 : Synaptosomal-associated protein 25
SUMO : Small Ubiquitin-like modifier
TAS1R : Taste receptor, type 1
TAS2R : Taste receptor, type 2
TCEP : Tris (2-carboxyethyl) phosphine
TFA : Acide trifluoroacétique
TM3 : Hélice transmembranaire 3
TNB : Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TRPV : Transient receptor potential vanilloid
TRPM5 : Transient receptor potential melastin 5
TRX : Thioredoxine A
VFT : Venus Flytrap
VIP : Peptide vaso intestinal
Zw : Zwiterrionique

Introduction

et objectifs

Objectifs de la thèse :

Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre les interactions structure–fonction avec les molécules sapides en combinant différents systèmes d'expression de protéines recombinantes des récepteurs gustatifs et des approches biochimiques.

En **première partie** de ce manuscrit, l' « **Etat de l'art** », présente une description détaillée de la physiologie du système gustatif chez l'Homme, qui est suivie d'une synthèse des connaissances actuelles sur les récepteurs gustatifs et leurs mécanismes d'activation par les molécules sapides. Enfin, une partie « Approches expérimentales » introduit les principales techniques utilisées en biochimie des RCPG ou en test d'activité fonctionnelle reposant sur des cellules vivantes pour étudier les récepteurs et leur interaction *in vitro* avec les molécules sapides afin de mieux appréhender celles utilisées dans nos recherches.

Cette partie est complétée par un article réalisé au début de ma thèse couvrant une présentation large des connaissances actuelles sur les molécules sucrées et les édulcorants. Je passe en revue les différentes catégories de molécules sucrées dont certaines sont émergentes. Je présente les bases biochimiques de leur détection par le récepteur au goût sucré TAS1R2/TAS1R3. Je discute des effets physiologiques des molécules sucrées en lien avec leur impact sur la santé.

Cet article a été référencé sous :

❖ **Belloir C**, Neiers F, Briand L. Sweeteners and sweetness enhancers. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. **2017**, 20 (4) : 279-285.

La **seconde partie** est constituée de **4 articles scientifiques** (un accepté et trois autres à soumettre) retraçant les recherches que j'ai effectuées, les méthodologies développées pour l'étude des récepteurs gustatifs et les résultats obtenus y sont discutés. Tous ces articles sont transdisciplinaires et tentent de répondre à des questions aussi bien pratiques que fondamentales. Les questions pratiques auxquelles je souhaite répondre sont les suivantes : quels sont les apports et la pertinence des différents modèles cellulaires d'expression des protéines recombinantes pour l'étude *in vitro* des récepteurs gustatifs ? Selon ces modèles, est-il possible d'obtenir des quantités suffisantes de récepteur fonctionnel pour des études biochimiques et structurales ? Quel est l'impact des détergents sur la solubilisation, purification et fonctionnalité des récepteurs du goût ? Comment est-il possible d'améliorer l'expression et l'adressage des récepteurs gustatifs à la membrane plasmique ? Les questions fondamentales que j'aborderai sont les suivantes : quelle est la contribution de

chaque sous-unité dans la détection des molécules sapides ? Comment les interactions récepteurs-molécules sapides expliquent-ils les phénomènes de synergie ?

Le premier article présenté dans cette thèse correspond à l'étude des caractéristiques biochimiques et fonctionnels de la sous-unité TAS1R1-DNT du récepteur umami TAS1R1/TAS1R3 du chat. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société Mars PetCare (WALTHAM Centre for Pet Nutrition) dans le cadre d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui interviennent dans la détection des acides aminés. En effet, les chats domestiques sont des carnivores obligés. Les analyses sensorielles ont montré que les chats affichent de fortes préférences pour certains acides aminés de la série L comme notamment le L-His et la L-Ala. Chez l'homme, comme nous l'avons vu, le DNT de la sous-unité TAS1R1 contient le site de liaison principal pour les stimuli umami, tels que le L-Glu, et l'IMP qui se lie à un site adjacent du L-Glu sur TAS1R1-DNT, créant une réponse synergique entre le L-Glu et l'IMP. Les études de liaison TAS1R1/TAS1R3 ont révélé des différences dépendantes des espèces étudiées. Nous avons surexprimé le TAS1R1-DNT de chat (cTAS1R1-DNT) en corps d'inclusion à l'aide de *E. coli*. Après purification, le repliement *in vitro* de la protéine a été réalisé. Des études spectroscopiques par dichroïsme circulaire ont révélé que cTAS1R1-DNT était bien replié attestant la présence de structures secondaires. En utilisant la chromatographie par exclusion de taille couplée à la diffusion de la lumière, nous avons constaté que cTAS1R1-DNT se comportait comme un monomère. La liaison de ligands, quantifiée par la fluorescence intrinsèque du tryptophane, a montré que cTAS1R1-DNT était capable de se lier aux acides aminés de série L avec des valeurs de K_d de l'ordre du micromolaire. Nous avons démontré que l'IMP potentialise la liaison de certains L-amino acides sur cTAS1R1-DNT. Fait intéressant, nos résultats ont révélé que l'IMP se lie au domaine extracellulaire en l'absence d'acides aminés. Cette étude a démontré la faisabilité de produire des quantités en milligrammes de cT1R1-DNT pour des études fonctionnelles et structurales.

Cet article est référencé sous :

❖ **Belloir C**, Savistchenko J, Neiers F, Taylor AJ, McGrane S, Briand L. Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in *Escherichia coli*. PLoS One. **2017**, 30;12(10):e0187051.

Le second article démontre la contribution de la sous-unité TAS1R3 dans la perception du goût umami et sucré. Dans une première étape, la contribution de chaque sous-unité TAS1R1 et TAS1R3 constituant le récepteur au goût umami a été évaluée. Pour cela, les DNT de TAS1R1 et TAS1R3 ont été surexprimés en corps d'inclusion en bactérie *E. coli*. Le protocole de repliement de la protéine a été amélioré en intégrant une étape de

chromatographie IMAC. Les deux sous-unités ont ainsi été produites en grande quantité. Des spectres de dichroïsme circulaire mesurés dans l'UV lointain ont révélé que TAS1R1-DNT et TAS1R3-DNT étaient bien repliés. Les analyses par SEC-MALS montrent que les protéines sont présentes dans les conditions étudiées sous forme monomérique. Les études d'interaction par fluorescence intrinsèque confirment que TAS1R1-DNT lie les deux acides aminés L-Glu et L-Asp ainsi que l'IMP avec des affinités de l'ordre du micromolaire et que l'IMP synergise la réponse de L-Glu et L-Asp. De façon intéressante, la sous-unité TAS1R3-DNT est aussi capable de lier L-Glu, L-Asp et l'IMP. Comme la sous-unité TAS1R3 est commune aux récepteurs au goût sucré et umami, j'ai émis l'hypothèse que l'IMP pouvait affecter la perception sucrée. Pour le vérifier, j'ai utilisé un test cellulaire basé sur les mesures de calcium intracellulaire et démontré que l'IMP augmente la réponse du récepteur humain au goût sucré TAS1R2/TAS1R3 lorsqu'il est stimulé par le sucralose et le néotame confirmant ainsi que l'IMP se lie à la sous-unité TAS1R3.

Cet article est référencé sous :

❖ **Belloir C**, Poirier N, Neiers F, Briand L. The 5'-ribonucleotide IMP interacts with the human TAS1R3 sweet taste subunit to enhance sweet taste detection. A soumettre à : Scientific Reports.

Un troisième article méthodologique décrit une nouvelle stratégie expérimentale pouvant être utilisée pour produire la sous-unité TAS1R2 entière afin d'évaluer sa contribution dans les interactions avec les molécules sucrées. Pour cela, j'ai utilisé une lignée cellulaire inductible par la tétracycline, les cellules HEK293-GnTI$^-$. Après transfection du cDNA codant la sous-unité TAS1R2 et sélection clonale d'une lignée stable, j'ai produit à grande échelle des membranes cellulaires pour en extraire la sous-unité TAS1R2. Après criblage de quelques détergents, le protocole de solubilisation et purification a permis d'obtenir quelques microgrammes de TAS1R2 purifié. Les analyses par dichroïsme circulaire ont montré que la sous-unité TAS1R2 est correctement repliée et présente des contenus en structures secondaires attendus. Les analyses par SEC-MALS ont montré que la sous-unité est majoritairement sous forme de dimère. Les mesures d'interactions ligand-récepteur par fluorescence intrinsèque ont montré que TAS1R2 est capable de lier diverses molécules sucrées, comme le sucralose, le néotame, l'acésulfame K et la périllartine qui étaient connues pour interagir avec cette sous-unité. Les valeurs de K_d mesurées sont corrélées aux mesures d'interactions réalisées en tests cellulaires et sont en accord avec données physiologiques/sensorielles.

Cet article est référencé sous :

❖ **Belloir C**, Brulé M, Tornier L, Neiers F, Briand L. Biophysical and functional characterization of the human TAS1R2 sweet taste receptor expressed in HEK293S inducible cell line. A soumettre à : PloSone.

Un dernier article ciblé sur l'étude du récepteur à l'amertume TAS2R14 a pour objectif d'améliorer l'expression du récepteur membranaire et son adressage à la membrane plasmique. En effet ces deux paramètres sont les principaux facteurs connus pour limiter l'étude de la fonctionnalité de certains RCPGs. Pour cela différents vecteurs d'expression ont été conçus et évalués pour la fonctionnalité du récepteur après transfection transitoirement dans des cellules HEK293 exprimant la chimère Gα16-gustducine. Les résultats montrent que l'addition de la séquence QBI SP163 en amont du codon d'initiation de la traduction, l'utilisation du peptide signal de la somatostatine 3 de rat en position N-terminale et de l'étiquette FLAG en position C-terminale, augmentent la réponse fonctionnelle du récepteur TAS2R14 aux composés amers aussi bien en amplitude qu'en sensibilité. Cette stratégie de construction pourra servir de base à l'étude des 25 récepteurs à l'amer et à l'identification d'agonistes pour les TAS2R orphelins.

Cet article est référencé sous :

❖ **Belloir C**, Delompré T, Jeannin M, Neiers F, Briand L. Improving human TAS2R14 functional activation in heterologous cell based assays. A soumettre à : Chemical Senses.

La **troisième partie**, « **Conclusions générales et perspectives** », dégage les principales conclusions de cette thèse et leurs perspectives.

Partie 1 :

Etat de l’art

Avant propos

Dans les sociétés occidentalisées, il est établi qu'un certain nombre de pathologies trouvent leurs origines dans de mauvaises habitudes alimentaires. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type 2, des maladies cardio-vasculaires et de l'ostéoporose. Dans ce contexte, la réduction de la teneur en sel ou en sucre dans les produits alimentaires représente aujourd'hui un enjeu majeur en termes de santé publique. Les teneurs en sel et en sucre sont détectées grâce à la gustation. Le goût, avec l'odorat, la vue, le toucher et l'ouïe, est l'un des cinq sens dont l'Homme est doté pour percevoir son environnement. Le sens du goût est essentiel à la survie des animaux, il conditionne en grande partie notre comportement alimentaire, en favorisant la consommation de molécules à valeurs nutritives élevées, telles que les molécules sucrées, tout en évitant certaines substances potentiellement toxiques. Cependant, même si elle nous semble familière, la gustation est un sens complexe et qui n'est étudié que très récemment d'un point de vue moléculaire.

Bien avant la découverte des récepteurs du goût, les recherches pour diminuer les apports caloriques ont abouti à l'identification de molécules à la saveur sucrée appelées édulcorants qui représentent l'avantage de ne pas (ou peu) apporter de calories. Cependant, ces édulcorants naturels ou synthétiques font aujourd'hui l'objet de nombreuses critiques (arrière-goûts désagréables, effets sur le métabolisme glucidique, doutes sur leur innocuité, etc.). De même, l'addition du glutamate monosodique, de saveur umami est largement utilisée comme exhausteur de goût pour diminuer l'adjonction de sel dans les produits alimentaires industriels et les rendre encore plus savoureux et authentiques. Dans ce contexte, les industries agro-alimentaires recherchent et développent de nouvelles molécules et s'intéressent de plus en plus à la compréhension des mécanismes moléculaires de détection du goût.

La découverte des récepteurs humains aux goûts sucré et umami au début des années 2000 (Matsunami *et al.* 2000), a ouvert la voie à des études permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les premières étapes de détection de ces molécules sapides. Ces travaux se sont enrichis par la suite par de nombreuses données sur le rôle des récepteurs humains au goût amer. Etant donné l'importance des enjeux socio-économiques, la compréhension des mécanismes d'interactions entre les molécules sapides et les récepteurs au goût s'avère donc cruciale.

Dans ce travail de thèse, j'ai développé différentes méthodes *in vitro* d'expression hétérologue et fonctionnelle des récepteurs des goûts sucré, umami et amer afin d'étudier les mécanismes biochimiques impliqués dans les interactions récepteurs-ligands. Ce manuscrit de thèse est présenté en partie sous forme d'articles publiés ou prêts à être soumis. Les

questions auxquelles je souhaite répondre sont : quel est le rôle de chacune des sous-unités du récepteur umami et sucré dans la perception des molécules sapides ? Quels sont les déterminants moléculaires des interactions entre les récepteurs et les composés sapides ?

I. Qu'est-ce que le goût ?

I.1. Le goût et les saveurs primaires

Avec le toucher, la vue, l'ouïe et l'odorat, le goût est l'un des cinq sens dont l'Homme est doté pour percevoir son environnement. Le terme « goût » désigne l'ensemble complexe des informations sensorielles correspondant à la flaveur qui regroupe trois types de sensations : olfactives, gustatives et somesthésiques.

La composante somesthésique de la flaveur regroupe les sensations trigéminales qui informent sur les propriétés physiques des aliments, tels que la texture, la température de l'aliment et son caractère piquant ou rafraîchissant. C'est le nerf trijumeau qui innerve les muqueuses de la bouche, du nez et de l'œil, et qui transmet ces sensations de température, de texture des aliments et de douleur qui participent à l'élaboration du goût. Lors de la mastication d'un aliment, les molécules odorantes volatiles sont libérées de la matrice alimentaire et remontent vers la cavité nasale par l'arrière du voile du palais. On parle de perception olfactive rétro-nasale. Ces molécules sont détectées par les récepteurs olfactifs situés sur les cils des neurones olfactifs présents dans l'épithélium olfactif qui est couvert par une couche de mucus olfactif. On prend généralement conscience de cette sensation olfactive en cas d'anosmie (perte du sens de l'olfaction), ce qui est le cas si on déguste un aliment avec un pince nez ou lors d'un rhume. La gustation, au sens physiologique du terme, est perçue uniquement par les papilles gustatives situées à la surface de la langue. Un composé sapide est défini par différentes composantes : sa qualité (par exemple sucrée ou amère), son intensité (plus ou moins forte), sa longueur en bouche et son caractère hédonique (saveur agréable ou non).

Communément, on distingue quatre saveurs ou goûts dits « fondamentaux » ou « primaires » (**Figure 1**). La saveur salée signale à l'individu la présence de certains minéraux comme le chlorure de sodium. Celui-ci est indispensable à l'équilibre osmotique des organismes. Le goût sucré permet de signaler la présence de glucides qui sont une source d'énergie directement assimilable. L'amer est souvent considéré comme un signal d'alerte de la présence de molécules toxiques et est à l'origine de nombreuses aversions. Le goût acide nous permet d'évaluer la présence de contaminations microbiennes et d'évaluer le degré de maturité de certains fruits (Briand and Salles 2016). Il existe une cinquième saveur souvent moins connue, appelée umami, qui signale la présence d'aliments riches en acides aminés ou protéines.

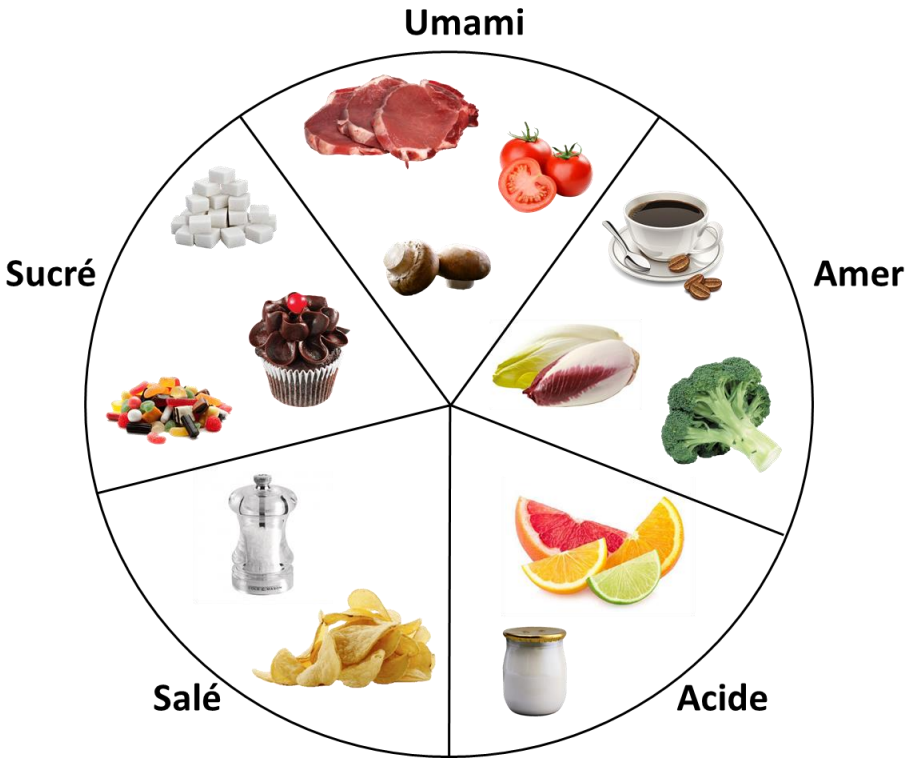

Figure 1 : Illustration simplifiée des 5 saveurs primaires ou fondamentales.
Le goût repose sur la détection de 5 saveurs fondamentales.

Une saveur fondamentale répond à plusieurs caractéristiques : 1) un goût perceptible et unique distinct des autres goûts primaires, 2) qui est induit par une classe définie de stimuli, 3) mettant en jeu un mécanisme spécialisé de transduction du signal, 4) conduisant à un signal véhiculé par les nerfs gustatifs, 5) et qui entraîne une réponse physiologique et comportementale. Bien que pratique et rationnel, le concept des goûts primaires ne prend pas en compte d'autres perceptions gustatives, telles que le goût du gras, du calcium ou le goût métallique.

Il faut souligner que les seuils de perception pour ces différentes saveurs sont très variables et directement corrélés aux besoins physiologiques sous tendant leurs détections. L'être humain est très sensible aux molécules amères avec des seuils de perception qui peuvent atteindre des concentrations micromolaires ou sub-nanomolaires (par exemple 8 µM pour la quinine, 0,5 nM pour le benzoate de dénatonium) mais peu sensible aux sucres naturels avec des seuils de détection de l'ordre du millimolaire (par exemple 25 à 50 mM pour le saccharose).

I.2. Les goûts salé et acide

Le goût salé permet de maintenir l'homéostasie hydrominérale. L'être humain n'étant pas capable de stocker le sodium, il doit donc avoir des apports suffisants pour compenser ses pertes lors des processus excrétoires et sécrétoires (urine et sueur). En agroalimentaire, le sel est impliqué dans la structuration des produits et pour certains d'entre eux, il garantit une certaine sécurité microbiologique. Il joue aussi un rôle fondamental dans la qualité organoleptique des aliments. La perception du salé dans les aliments est principalement due à la présence de chlorure de sodium mais d'autres sels, organiques ou minéraux, peuvent présenter une composante salée plus ou moins intense (van der Klaauw and Smith 1995), comme par exemple le chlorure de potassium, de lithium, d'ammonium, sulfate, tartrate, citrate, acétate de sodium. Cependant la consommation excessive de sel agit comme un facteur de développement des maladies cardiovasculaires. C'est pourquoi différentes stratégies de réduction ont été menées avec plus ou moins de succès (Salles *et al.* 2017, Thomas-Danguin and Guichard 2019). Elles sont principalement basées sur l'utilisation de renforçateurs de l'intensité de perception du salé, de substituants au chlorure de sodium et sur la modification de la structure de la matrice alimentaire. Par exemple, la perception du salé est renforcée par des arginyl dipeptides présents dans des sauces fermentées et des hydrolysats de protéines (Schindler *et al.* 2011).

La saveur acide peut être recherchée et appréciée dans l'alimentation. On la trouve naturellement présente dans certains légumes et fruits parmi lesquels on peut citer l'oseille et la rhubarbe. Cette saveur est très largement trouvée dans les fruits tels que les citrons ou les agrumes en général, les framboises, les groseilles, les cassis, les raisins, certaines variétés de pommes, les kiwis ou encore les tomates. L'acidité peut être utilisée volontairement comme par exemple lors de l'emploi du jus de citron dans les préparations culinaires, ou résulter d'un processus volontaire de transformation des aliments comme par exemple dans la préparation des choucroutes, des vinaigres et des condiments de type cornichons et pickles. Plus récemment, l'apparition des bonbons ultra-acides ont vu leurs ventes exploser. Cependant, la perception de l'acidité peut être considérée comme un indicateur de la maturité et du degré de fermentation des fruits. Elle permet aussi de détecter une contamination microbienne car de nombreux micro-organismes produisent des acides. Le goût acide permet aussi de protéger l'organisme contre une consommation élevée d'acides qui pourraient endommager les tissus et la dentition. En revanche, une faible acidité est perçue comme plaisante alors qu'une forte acidité provoque une sensation de rejet (Ganchrow *et al.* 1986).

I.3. Diversité des molécules sucrées

La détection des molécules sucrées permet l'identification de nutriments riches en énergie directement assimilable. Chez de nombreuses espèces animales la saveur sucrée est perçue comme une sensation agréable et joue un rôle prépondérant dans le comportement alimentaire (molécule appétente). Certains travaux menés chez les rongeurs discutent le caractère addictif du sucre (Ahmed *et al.* 2013, Madsen and Ahmed 2015). De là est née l'idée dans la communauté scientifique que chez l'homme le sucre pourrait être addictif au même titre qu'une drogue. En fait, il n'en est rien, le sucre et les effets neurochimiques qu'il déclenche au niveau du cerveau, ont plus en commun avec les expériences de plaisir normales (comme le rire, écouter de la musique) qui provoquent la libération de dopamine, qu'avec les effets de la dépendance liée aux médicaments. Il a été montré chez l'homme que le sucre ne contribue pas d'avantage à la prise de poids que d'autres sources d'énergie dans l'alimentation mais que la consommation d'aliments appétissants (contenant principalement ou uniquement du sucre) peut devenir une expérience émouvante ou réconfortante sur le plan émotionnel et favoriser sa consommation au-delà des besoins nutritionnels immédiats (Markus *et al.* 2017).

Article 1 : Sweeteners and sweetness enhancers

De nombreuses molécules peuvent générer un goût sucré chez l'être humain. Il est intéressant de noter que leurs structures sont très diverses ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. Ce premier article, qui est une mise au point, rédigée en 2017 au début de ma thèse, décrit de façon non exhaustive la diversité des molécules sucrées existantes ou émergentes. Cette revue de littérature soulève par ailleurs la question du risque potentiel pour la santé de ces substituts du sucre compte tenu des rôles nouvellement identifiés du récepteur du goût sucré dans la régulation de certains processus métaboliques. Cet article résume les connaissances actuelles sur les édulcorants et discute leur potentiel impact sur la santé.

Cet article est référencé sous :

❖ **Belloir C**, Neiers F, Briand L. Sweeteners and sweetness enhancers. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. **2017**, 20 (4) : 279-285.

REVIEW

Sweeteners and sweetness enhancers

Christine Belloir, Fabrice Neiers, and Loïc Briand

Purpose of review
The current review summarizes and discusses current knowledge on sweeteners and sweetness enhancers.

Recent findings
The perception of sweet taste is mediated by the type 1 taste receptor 2 (T1R2)/type 1 taste receptor 3 (T1R3) receptor, which is expressed in the oral cavity, where it provides input on the caloric and macronutrient contents of ingested food. This receptor recognizes all the compounds (natural or artificial) perceived as sweet by people. Sweeteners are highly chemically diverse including natural sugars, sugar alcohols, natural and synthetic sweeteners, and sweet-tasting proteins. This single receptor is also the target for developing novel sweet enhancers. Importantly, the expression of a functional T1R2/T1R3 receptor is described in numerous extraoral tissues. In this review, the physiological impact of sweeteners is discussed.

Summary
Sweeteners and sweetness enhancers are perceived through the T1R2/T1R3 taste receptor present both in mouth and numerous extraoral tissues. The accumulated knowledge on sugar substitutes raises the issue of potential health effects.

Keywords
carbohydrate, diabetes, obesity, sweet taste receptor, sweetener

INTRODUCTION

Sweeteners and sweetness enhancers are widely used as food additives, in beverages, dietary supplements, and pharmaceuticals. Sweet-tasting compounds can be categorized into different types according to their origin (natural or artificial), their technical qualities (sweetness and aftertaste, solubility, stability and ability to be cooked), their nutritional value (caloric or noncaloric and digestibility), and their sweetness potency [1]. New sweeteners including sweet-tasting proteins and sweet enhancers are in the process of development in the food industry. The oral detection of all sweeteners, including carbohydrates and noncaloric sweeteners, is performed by the heterodimeric type 1 taste receptor 2 (T1R2)/type 1 taste receptor 3 (T1R3) receptor [2]. This receptor contains multiple binding sites, explaining the chemical diversity of sweet-tasting compounds [3]. The T1R2/T1R3 sweet taste receptor has been shown to be expressed in a variety of extraoral organs. In this review, natural and artificial sweeteners and sweetness enhancers are described. Recent discoveries regarding the physiological functions of the sweet taste receptor in extraoral tissues in connection with sweeteners are summarized and discussed.

Natural carbohydrates

The crystal form of sucrose (disaccharide combination of glucose and fructose) is commonly referred to as table sugar and constitutes the reference compound for sensory evaluations to compare the potency of other sweet-tasting substances (Fig. 1). In addition to sucrose, other common natural disaccharides are widely used in the food industry, including maltose (formed by two units of glucose), lactose (derived from galactose and glucose), and trehalose (formed from two glucose units). Some sweet disaccharides such as trehalose are also used as stabilizers for food colouring and flavouring. Among monosaccharides, glucose elicits a sweet taste as fructose, which naturally occurs in fruits, honey, and certain root vegetables. The isomerization of aldo-disaccharides gives sweet keto-disaccharides, such as maltulose, isomaltulose

AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne-Franche Comté, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France

Correspondence to Loïc Briand, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne-Franche Comté, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 21000 Dijon, France. E-mail: loic.briand@inra.fr

Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2017, 20:279–285
DOI:10.1097/MCO.0000000000000377

1363-1950 Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

KEY POINTS

- The sweet taste T1R2/T1R3 receptor detects in the oral cavity all the chemically diverse compounds perceived as sweet by people. Sweeteners include natural sugars, sugar alcohols, natural and synthetic sweeteners, and sweet-tasting proteins.
- This sweet taste receptor is also expressed in numerous extraoral tissues where it has been demonstrated to be involved in metabolic regulation.
- Accumulated knowledge suggests potential health effects of sugar substitutes.

(palatinose), lactulose, cellobiulose, and melibiulose. New industrial methods based on subcritical aqueous ethanol instead of subcritical water have been shown to improve the yield of their production [4]. Currently, nearly all food industries use pure cornstarch as the source of carbohydrate sweeteners. The hydrolysis of starch produces various sweeteners including dextrose, corn syrup, maltodextrin, high-fructose corn syrup, artificial sweeteners, and crystalline fructose. In parallel with these conventional carbohydrates, we note the emergence of some original sources of fruit sugars, which gained in popularity as an alternative to traditional sweeteners. Therefore, agave nectar, extracted from *Agave tequilana* and *Agave salmiana*, is consumed in the Western region of Mexico and is rich in fructose and glucose [5]. Similarly, Jujube extracts from *Zizyphus jujube* Mill. drupe are commonly used in China as a new functional food additive. The Jujube extracted polysaccharides include rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, and maltose, which contribute to both sweetness and antioxidant properties [6].

Functional sweeteners: sugar alcohols (polyols), bulking agent, and rare sugar

Sugar alcohols, also named polyols such as sorbitol, mannitol, xylitol, and erythritol, are used as sweeteners. Naturally occurring in fruit and vegetables, they are large-scale commercialized. Polyols had been promoted as a sugar substitute for people with diabetes or to prevent tooth decay. Oligosaccharides are small-sized polymers of monosaccharides having two to 10 simple residues. Soluble in water, with a sweet taste, they are considered as bulking agent and prebiotic in food industry. They are physiologically active and may exhibit health benefits. Their resistance to digestion in the intestine is conducive to *Bifidobacterium* and *Lactobacilli* growth in the colon. Among this oligosaccharides, the fructo-oligosaccharides (FOS) obtained from inulin are used as sweeteners. Inulin constitutes a storage carbohydrate widely distributed in vegetables and mainly extracted from chicory at the industrial level. Biotechnological methods involving enzymology processing are intensively studied to increase its yield in large-scale production [7]. Growing interest is focused on the roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a source of FOS. This plant grows in the Andean region and contains one of the highest concentrations of FOS [8]. Finally, we highlight the development of rare sugar production, with the bioproduction of 34 rare hexose sugars using microbial enzymes to catalyse epimerization, isomerization, and oxidization–reduction by Izumoring strategy [9]. Among them, D-allulose (D-psicose) and D-tagatose were recognized as Generally Recognized As Safe: these compounds elicit a sweet taste without undesirable qualities. Interestingly, recent studies have shown that the consumption of D-allulose and D-tagatose could have an anti-obesity effect by decreasing body weight gain and abdominal fat and reducing plasma glucose and insulin levels during an oral glucose tolerance test [10▪].

Artificial sweeteners

Saccharin was the first commercially available artificial sweetener. Since then, semisynthetic peptides (aspartame and neotame) and synthetic chemicals (cyclamate, acesulfame-K, and sucralose) have been identified. Saccharin, cyclamate, and acesulfame-K belong to the chemical class of sulfamates. Sucralose is a chlorinated derivative of sucrose, whereas neotame and alitame are derivatives of aspartame. Sweeteners are often used in binary mixtures to improve the sweet taste and reduce off-tastes. The most recent and promising dipeptide is advantame, approved in 2014 by the Food and Drug Administration, a sweetener 20 000 times sweeter than sucrose with an excellent sugar-like taste, heat stability, and a low cost. Finally, dihydrochalcones are a promising chemical class of artificial sweeteners. The production of neohesperidin dihydrochalcone (NHDC), usually obtained chemically from the alkali hydrogenation of neohesperidin isolated from citrus peel, could be improved by recent findings based on engineered *Saccharomyces cerevisiae* [11]. Unfortunately, some artificial sweeteners might be perceived with a bitter, metallic, astringent, or unpleasant aftertaste by consumers. Some of these undesirable sensory qualities can be explained by genetic polymorphisms of bitter taste receptors [12,13].

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

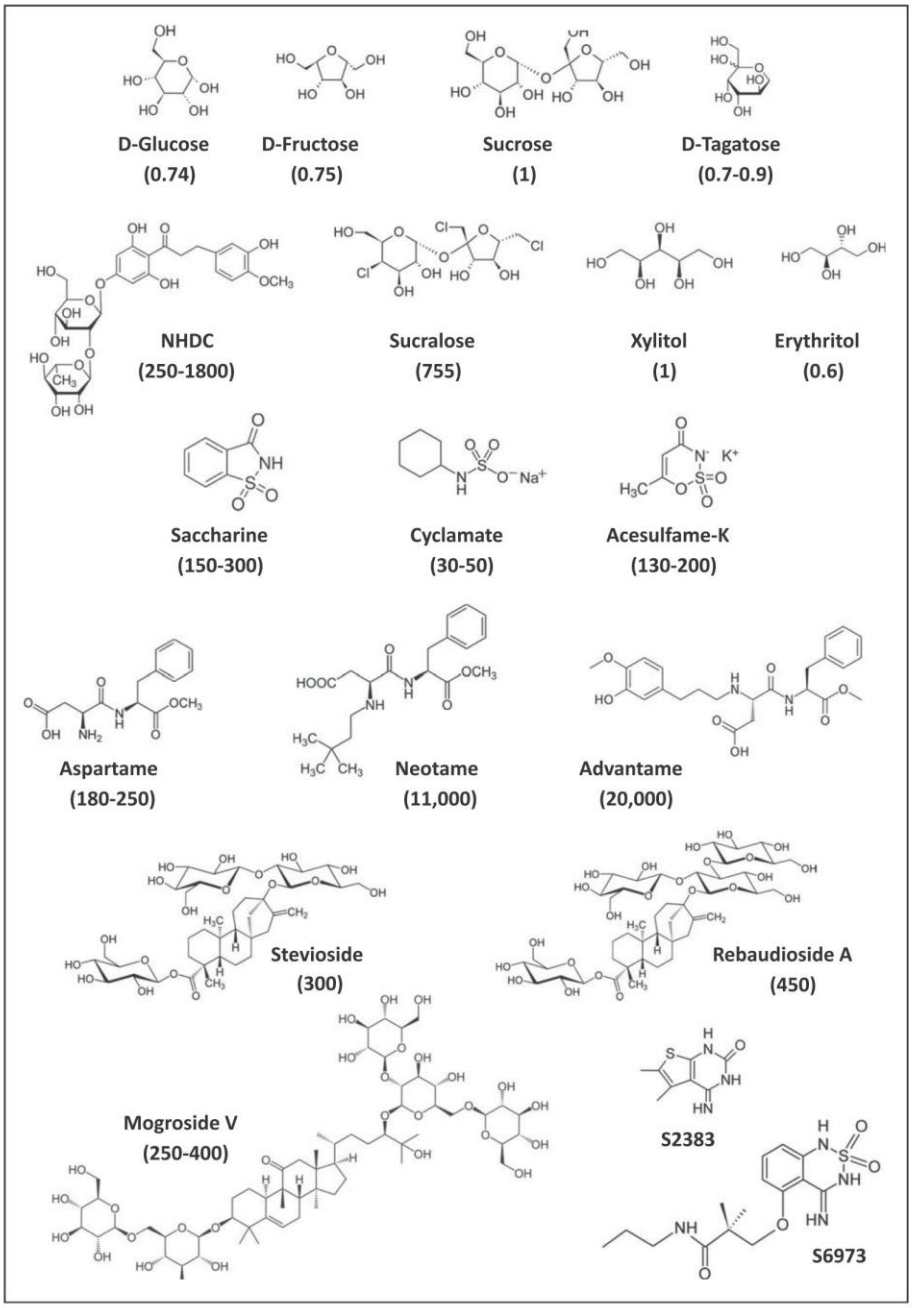

FIGURE 1. Schematic structure of the sweet taste compounds with their relative sweetness as compared with sucrose (between brackets).

Emerging natural sweeteners and sweet taste enhancers

The great demand for natural and healthy non-nutritive sweeteners has increased over recent years, so plants have been explored worldwide for their sweetener compositions. The extraction of *Stevia rebaudiana* leaves produces a mixture of nine terpenoids called steviol glucosides. From these compounds, only two molecules have been accepted as approved sweeteners, rebaudioside A and stevioside (Fig. 1). One of the major drawbacks for food application is their bitter and liquorice-like off-taste. A recent biotechnological process involving microbial production using the yeast *S. cerevisiae*

1363-1950 Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

led to a new generation of stevia sweeteners with a cleaner sweet taste. This engineered biosynthesis pathway involved the optimization of a glucosyltransferase to improve rebaudioside D and M productions [14]. The fruit of *Siraitia grosvenorii* (Swingle), also known as Lo Han Kuo (or Luo Han Guo) or Monk fruit, contains a mixture of curcurbitane-type triterpenoid saponins known as mogrosides (Fig. 1). The natural metabolic pathway of mogrosides has recently been elucidated, paving the way for the new biotechnological development of large-scale production using genetically modified plants or microorganisms [15▪].

Sweet taste enhancers are small molecules that can increase sweetness perception by the modulation of T1R2/T1R3 receptor activity. These compounds act as positive allosteric modulators and boost taste sensation, allowing significant reduction in carbohydrate content while maintaining the same taste. New research is focused on the identification and development of these new flavour ingredients, including trilobatine, rebaudioside C, thaumatin, and mogrosides. Other competing substances have been developed by Senomyx Inc.; San Diego, California, USA, a biotechnology company, such as S2383, S6973, S617, and S9632 [16].

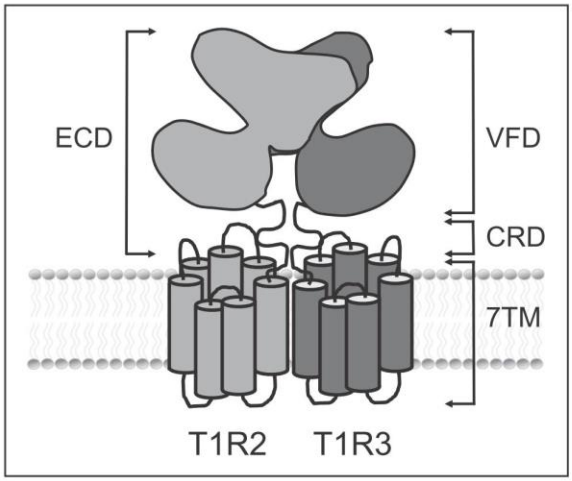

FIGURE 2. Schematic of the sweet taste type 1 taste receptor 2/type 1 taste receptor 3 receptor in the plasma membrane. The sweet taste receptor is made of two subunits, type 1 taste receptor 2 and type 1 taste receptor 3. Type 1 taste receptor 2 and type 1 taste receptor 3 have a large N-terminal domain that includes a Venus flytrap domain connected to a seventh transmembrane domain (characteristic of G protein-coupled receptors) by a short cysteine-rich linker domain.

Sweet-tasting and taste-modifying proteins

Six known sweet and taste-modifying plant proteins, namely, neoculin, brazzein, mabinlin, thaumatin, monellin, and miraculin, have been identified and characterized [17]. Miraculin is not sweet by itself but has the unusual property of converting sourness into sweetness. The most intense sweet-tasting proteins compared with sucrose on a weight basis are brazzein, monellin, and thaumatin, with sweetness factors of 1900 and 3000 for the last two, respectively [17]. Due to their high sweetness potency, good sensory properties, and a long history of human consumption, sweet-tasting proteins can be viewed as promising natural sweeteners. Sensory analysis has revealed that miracle fruit may constitute a natural alternative sugar substitute in sour beverages [18]. One of the major problems hindering the use of sweet-tasting proteins in food applications is the difficulty of obtaining proteins from their natural source. Recently, many efforts have been made to overexpress brazzein using various heterologous systems, including the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis* [17,19]. Site-mutagenesis experiments have been conducted to improve the sweetness of brazzein [20,21] and thaumatin [22]. Single-chain monellin has been engineered to increase its sweetness and to improve its thermal and pH-independent stability [23].

Biological basis of sweet taste detection

The heterodimeric sweet taste receptor (Fig. 2) consists of an assembly of two G protein-coupled receptors (GPCRs) named T1R2 (encoded by *TAS1R2* gene) and T1R3 (encoded by *TAS1R3* gene). T1R2 and T1R3 belong to the small family of class C GPCRs, which includes the metabotropic glutamate receptors, calcium-sensing receptor, and γ-aminobutyric acid B receptor. Class C GPCRs possess distinct features including a large N-terminal domain (ECD) connected to the seventh transmembrane domain (7TM) by a short cysteine-rich linker domain (CRD). The ECD of class C GPCRs adopts a bilobate structure and is also termed the Venus flytrap domain (VFD). The T1R2/T1R3 sweet taste receptor can detect all the various chemically diverse sweet-tasting compounds as previously stated [2,3]. It is well established that T1R2/T1R3 is the major sweet taste receptor. However, there is also evidence that T1R3 forms the homodimer T1R3/T1R3 in the absence of T1R2 [2]. This second sweet taste receptor has been shown to respond to natural monosaccharides and disaccharides and the chlorinated sucrose derivative sucralose [24]. The main components of the sweet taste transduction cascade have been identified. These components include the taste-selective Gα subunit, α-gustducin, the phospholipase C-β2, the inositol

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

1,4,5-triphosphate receptor, and type 3, and the transient potential ion channel TRPMP5 [25]. The VFD of T1R2 contains the primary binding site of the human sweet taste receptor, in which natural sugars (e.g., sucrose, glucose, and fructose) and certain molecular sweeteners (e.g., sucralose, aspartame, and saccharin) bind [26,27]. In addition, T1R3-VFD has been shown to bind natural sugars and sucralose. NHDC and cyclamate interact with the 7TM of T1R3, and T1R2/T1R3 activation by the sweet-tasting protein brazzein requires both the VFT of T1R2 and the CRD of T1R3 [27]. The presence of multiple binding sites on T1R2/T1R3 explains the sweet taste synergy that occurs in mixtures of sweeteners. Genetic studies have revealed sweet taste receptor polymorphism. A recent study revealed a *TAS1R2* polymorphism associated with a higher carbohydrate intake among the population of West Mexico [28,29]. A recent genetic study in a Korean population showed that variations in the *TAS1R* gene may have an impact on food intake [30]. There is evidence of a sweet-sensing pathway for detecting monosaccharides independently of T1R3. This pathway includes several glucose transporters, the sodium–glucose cotransporter 1, and the ATP-gated K^+ metabolic sensor [25]. Interestingly, Sukumaran *et al.* recently found that taste cells express α-glucosidase and disaccharide-hydrolysing enzymes. The authors proposed that these enzymes may locally break down dietary disaccharides and starch hydrolysis products into monosaccharides that can serve as substrates for the T1R-independent sweet-sensing pathways [31▪▪]. Remarkably, a recent study revealed that humans can taste oligomers of glucose with degrees of polymerization of 7 and 14, independently of T1R2/T1R3 [32].

Sweeteners and physiological effects

Since its discovery in the tongue, the T1R2/T1R3 sweet taste receptor has been shown to be widely expressed in numerous different organs including the gut, pancreas, brain, and adipose tissues. Although its physiological function is not clear, it has been demonstrated to be involved in metabolic regulation. In the pancreas, the T1R2/T1R3 receptor is involved in insulin secretion, whereas in the stomach or the gut it is involved in ghrelin release [25]. Leptin is a hormone produced by the adipose cells that participate in energy balance regulation by inhibiting hunger. Leptin is already known to suppress the sweet sensitivity of taste receptor cells present in the oral cavity via the leptin receptor [33]. Using mouse gut enteroendocrine cells, Jyotaki *et al.* [34] showed that leptin suppresses the sweet cell calcium responses to sucrose and sucralose, suggesting the involvement of T1R3-dependent receptor. These results highlight the regulatory role of leptin for intestinal sensitivity to sugars and certain sweeteners. In the gut, carbohydrates and artificial sweeteners can induce incretin release. A recent study using lean and obese participants demonstrated that xylitol and erythritol, unlike sucralose, stimulated the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) release in the gut [35]. In the brain, T1R2/T1R3 receptor expression has been shown to be modulated under various nutrient states or stresses, including obesity. Hypothalamic neurons are involved in energy homeostasis and potentially in the metabolic dysregulation observed in obese persons. Indeed, under normal physiological conditions, increased blood glucose concentration reduces the expression of sweet taste receptor genes in the hypothalamus. In contrast, T1R3 subunit expression is downregulated in the hypothalamic neurons of obese mice compared with control mice [36▪▪]. Interestingly, a recent study revealed that T1R2-KO mice have reduced fat mass compared with wild-type mice. This finding supports a key role of T1R2 in the regulation of adipose tissue biology [37▪▪].

Sweeteners and obesity

The causal link between sweetener consumption and obesity has recently been subjected to numerous studies. A statistical analysis conducted on a cohort with participants aged 20 years and older suggested a correlation between the chronic usage of low-calorie sweeteners and an increasing obesity risk [38]. Another study on older people (aged 65 years and older) showed that increasing diet soda intake is associated with increasing abdominal obesity [39]. Obesity is known to be a major risk factor leading to the development of type 2 diabetes. A Swedish cohort analysis suggested that high-sweetened beverage intake is a potential risk factor for type 2 diabetes and autoimmune diabetes [40]. One short-term study investigated the metabolic effects of nonnutritive sweeteners (sucralose and acesulfame-K) in human participants. Surprisingly, these nonnutritive sweeteners increase the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) response to oral glucose only when they are present in diet soda but not in water [41]. The chemically diverse sweeteners do not lead to the same physiological effects. For example, the replacement of 50 g/day of sucrose by isomaltulose in food and beverages does not modify the HbA1C (a long-term glycaemic index) but significantly lowers triglycerides [42]. Recently, it was shown that sucralose included in high-fat solid meal, elevates triglycerides [43]. Remarkably, preloading

1363-1950 Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

consumption sweetened with aspartame, stevia, or mogroside does not lead to compensation of the total daily energy intake of the human participant, in contrast to sucrose [44]. Finally, a recent study revealed that sweeteners have an impact on commensal gut microbiota. The pig digestive system is close to the human digestive system. A study conducted in pigs demonstrated that NHDC perceived as sweet by pigs modifies the growth of commensal gut *Lactobacillus* and enhances the expression of specific sugar transporters in these bacteria [45▪].

CONCLUSION

The sweet taste makes it possible to detect carbohydrates and to ensure energy-rich nutrient intake. The sweet taste receptor is important for providing input on the macronutrient and caloric contents of the ingested meal. In the mouth, sweet taste recognition is achieved by the heterodimeric T1R2 and T1R3 receptors. Remarkably, this single sweet taste receptor can detect all of the chemically diverse sweet-tasting compounds, including natural carbohydrates, natural and artificial sweeteners, and sweet-tasting plant proteins. The newly identified roles of the sweet taste receptor in the regulation of metabolic processes highlight the question of the potential health risks of sugar substitutes. It can be concluded that sweeteners lead to different physiological effects depending on chemical structure, acting directly via the sweet taste receptor or indirectly on hormones or the microbiota.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Marie-Chantal Canivenc-Lavier for valuable comments on the article.

Financial support and sponsorship

The work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and the European Regional Development Fund (ERDF).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:
- ▪ of special interest
- ▪▪ of outstanding interest

1. Das A, Chakraborty R. An introduction to sweeteners. In: Merillon J-M, Ramawat KG, editors. Sweeteners: pharmacology, biotechnology, and applications. Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 1–13.
2. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, *et al.* Mammalian sweet taste receptors. Cell 2001; 106:381–390.
3. Li X, Staszewski L, Xu H, *et al.* Human receptors for sweet and umami taste. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:4692–4696.
4. Gao DM, Kobayashi T, Adachi S. Production of keto-disaccharides from aldo-disaccharides in subcritical aqueous ethanol. Biosci Biotechnol Biochem 2016; 80:998–1005.
5. Willems JL, Low NH. Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis. J Agric Food Chem 2012; 60:8745–8754.
6. Sun S, Wang H, Xie J, Su Y. Simultaneous determination of rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, maltose in jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) extract: comparison of HPLC–ELSD, LC–ESI–MS/MS and GC–MS. Chem Cent J 2016; 10:25.
7. Flores-Maltos DA, Mussatto SI, Contreras-Esquivel JC, *et al.* Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. Crit Rev Biotechnol 2016; 36:259–267.
8. Caetano BF, de Moura NA, Almeida AP, *et al.* Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: health-promoting benefits of fructooligosaccharides. Nutrients 2016; 8:436.
9. Zhang W, Zhang T, Jiang B, Mu W. Enzymatic approaches to rare sugar production. Biotechnology advances 2017; 35:267–274.
10. Shintani T, Yamada T, Hayashi N, *et al.* Rare sugar syrup containing D-allulose ▪ but not high-fructose corn syrup maintains glucose tolerance and insulin sensitivity partly via hepatic glucokinase translocation in Wistar rats. J Agric Food Chem 2017. [Epub ahead of print]

This study showed that rare sugar syrup containing D-allulose, D-sorbose, and D-tagatose can maintain glucose homeostasis and insulin release during a glucose tolerance test in rats by enhancing the blood glucose to glycogen conversion in the liver via glucokinase translocation between the nucleus and cytoplasm.

11. Eichenberger M, Lehka BJ, Folly C, *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties. Metab Eng 2017; 39:80–89.
12. Behrens M, Meyerhof W. Vertebrate bitter taste receptors: keys for survival in changing environments. J Agric Food Chem 2017. [Epub ahead of print]
13. Bobowski N, Reed DR, Mennella JA. Variation in the TAS2R31 bitter taste receptor gene relates to liking for the nonnutritive sweetener acesulfame-K among children and adults. Sci Rep 2016; 6:39135.
14. Olsson K, Carlsen S, Semmler A, *et al.* Microbial production of next-generation stevia sweeteners. Microbial cell factories 2016; 15:207.
15. Itkin M, Davidovich-Rikanati R, Cohen S, *et al.* The biosynthetic pathway of the ▪ nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii*. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113:E7619–E7628.

An important genomic and transcriptomic study that accurately describes the metabolic pathways of mogroside biosynthesis during the fruit development of the plant. This understanding opens up new opportunities to develop extensive biotechnological methods to produce the specific mogroside V.

16. Leach K, Gregory KJ. Molecular insights into allosteric modulation of Class C G protein-coupled receptors. Pharmacol Res 2017; 116:105–118.
17. Neiers F, Naumer C, Krohn M, Briand L. The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications. In: Merillon J-M, Ramawat KG, editors. Sweeteners: pharmacology, biotechnology, and applications. Cham: Springer International Publishing; 2016. pp. 1–20.
18. Rodrigues JF, Andrade RD, Bastos SC, *et al.* Miracle fruit: an alternative sugar substitute in sour beverages. Appetite 2016; 107:645–653.
19. Yun CR, Kong JN, Chung JH, *et al.* Improved secretory production of the sweet-tasting protein, brazzein, in *Kluyveromyces lactis*. J Agric Food Chem 2016; 64:6312–6316.
20. Ghanavatian P, Khalifeh K, Jafarian V. Structural features and activity of Brazzein and its mutants upon substitution of a surfaced exposed alanine. Biochimie 2016; 131:20–28.
21. Singarapu KK, Tonelli M, Markley JL, Assadi-Porter FM. Structure-function relationships of brazzein variants with altered interactions with the human sweet taste receptor. Protein Sci 2016; 25:711–719.
22. Masuda T, Ohta K, Ojiro N, *et al.* A hypersweet protein: removal of the specific negative charge at Asp21 enhances thaumatin sweetness. Sci Rep 2016; 6:20255.
23. Leone S, Pica A, Merlino A, *et al.* Sweeter and stronger: enhancing sweetness and stability of the single chain monellin MNEI through molecular design. Sci Rep 2016; 6:34045.
24. Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, *et al.* The receptors for mammalian sweet and umami taste. Cell 2003; 115:255–266.
25. Neiers F, Canivenc-Lavier MC, Briand L. What does diabetes 'Taste' like? Curr Diab Rep 2016; 16:49.
26. Behrens M, Meyerhof W, Hellfritsch C, Hofmann T. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. Angew Chem Int Ed Engl 2011; 50:2220–2242.
27. DuBois GE. Molecular mechanism of sweetness sensation. Physiol Behav 2016; 164 (Pt B):453–463.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

28. Dias AG, Eny KM, Cockburn M, *et al.* Variation in the TAS1R2 gene, sweet taste perception and intake of sugars. J Nutrigenet Nutrigenomics 2015; 8:81–90.

29. Ramos-Lopez O, Panduro A, Martinez-Lopez E, Roman S. Sweet taste receptor TAS1R2 polymorphism (Val191Val) is associated with a higher carbohydrate intake and hypertriglyceridemia among the population of west Mexico. Nutrients 2016; 8:101.

30. Choi JH, Lee J, Choi IJ, *et al.* Variations in TAS1R taste receptor gene family modify food intake and gastric cancer risk in a Korean population. Mol Nutr Food Res 2016; 60:2433–2445.

31. ■■ Sukumaran SK, Yee KK, Iwata S, *et al.* Taste cell-expressed alpha-glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113:6035–6040.

This important study demonstrates that taste cells express α-glucosidase enzymes, which contribute to taste detection of disaccharides.

32. Lapis TJ, Penner MH, Lim J. Humans can taste glucose oligomers independent of the hT1R2/hT1R3 sweet taste receptor. Chem Senses 2016. [Epub ahead of print]

33. Yoshida R, Noguchi K, Shigemura N, *et al.* Leptin suppresses mouse taste cell responses to sweet compounds. Diabetes 2015; 64:3751–3762.

34. Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, *et al.* Leptin suppresses sweet taste responses of enteroendocrine STC-1 cells. Neuroscience 2016; 332:76–87.

35. Wolnerhanssen BK, Cajacob L, Keller N, *et al.* Gut hormone secretion, gastric emptying, and glycemic responses to erythritol and xylitol in lean and obese subjects. Am J Physiol Endocrinol Metab 2016; 310:E1053–E1061.

36. ■■ Herrera Moro Chao D, Argmann C, Van Eijk M, *et al.* Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. Sci Rep 2016; 6:29094.

An important study showing that the level of expression of the sweet type 1 taste receptor 2 (T1R2)/type 1 taste receptor 3 (T1R3) receptor is modulated by the nutrient state. The obesity downregulates the expression level of the T1R3 sweet receptor subunit.

37. ■■ Smith KR, Hussain T, Karimian Azari E, *et al.* Disruption of the sugar-sensing receptor T1R2 attenuates metabolic derangements associated with diet-induced obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2016; 310:E688–E698.

This study strongly suggests that T1R2 plays a role in regulating energy homeostasis. Moreover, T1R2-mediated chemosensation alters fuel oxidation in peripheral tissues, contributing to adipocyte mass expansion and hyperinsulinaemia.

38. Chia CW, Shardell M, Tanaka T, *et al.* Chronic low-calorie sweetener use and risk of abdominal obesity among older adults: a cohort study. PLoS One 2016; 11:e0167241.

39. Fowler SP, Williams K, Hazuda HP. Diet soda intake is associated with long-term increases in waist circumference in a biethnic cohort of older adults: the San Antonio Longitudinal Study of Aging. J Am Geriatr Soc 2015; 63:708–715.

40. Lofvenborg JE, Andersson T, Carlsson PO, *et al.* Sweetened beverage intake and risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetes. Eur J Endocrinol 2016; 175:605–614.

41. Sylvetsky AC, Brown RJ, Blau JE, *et al.* Hormonal responses to nonnutritive sweeteners in water and diet soda. Nutr Metab 2016; 13:71.

42. Brunner S, Holub I, Theis S, *et al.* Metabolic effects of replacing sucrose by isomaltulose in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind trial. Diabetes Care 2012; 35:1249–1251.

43. Gallagher C, Keogh JB, Pedersen E, Clifton PM. Fructose acute effects on glucose, insulin, and triglyceride after a solid meal compared with sucralose and sucrose in a randomized crossover study. Am J Clin Nutr 2016; 103:1453–1457.

44. Tey SL, Salleh NB, Henry J, Forde CG. Effects of aspartame-, monk fruit-, stevia- and sucrose-sweetened beverages on postprandial glucose, insulin and energy intake. Int J Obes (Lond) 2017; 41:450–457.

45. ■ Daly K, Darby AC, Hall N, *et al.* Bacterial sensing underlies artificial sweetener-induced growth of gut *Lactobacillus*. Environ Microbiol 2016; 18:2159–2171.

A study conducted in pigs demonstrates that the neohesperidin dihydrochalcone modifies the growth of the commensal gut *Lactobacillus* and enhances the expression of specific sugar transporters by these bacteria.

1363-1950 Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

I.4. La saveur umami

Proposé pour la première fois en 1908 par le professeur Kikunae Ikeda, le goût umami signifie littéralement « goût savoureux » en japonais. Cette saveur est caractéristique de la cuisine asiatique.

Le goût umami n'a pas été reconnu comme tel par la communauté scientifique. Il aura fallu attendre les travaux menés par les scientifiques japonais Yamaguchi (Yamaguchi 1987) et Kurihara (Kurihara 2015, Kurihara and Kashiwayanagi 2000) pour faire accepter la saveur umami comme une saveur fondamentale. L'umami correspond chez l'homme à la saveur générée principalement par deux acides aminés, l'acide L-Glu et l'acide L-Asp (Maga 1983, Yamaguchi 1991). Le L-Glu est présent naturellement dans de nombreux aliments comme les viandes, les fromages, les fruits de mer, les tomates et les champignons. Il a été rapporté que le L-Glu sous sa forme acide, présente un goût umami moins perceptible à cause de l'acidité (Yamaguchi 1991). Cependant, lorsqu'il est associé aux cations comme le Na^+ ou le K^+ sous forme de sel, son goût umami devient plus prononcé (Kurihara 2015).

Chez l'Homme adulte, le seuil de détection du glutamate monosodique (MSG) est de 0,7 mM, seuil inférieur à celui du NaCl qui est de 5,7 mM. Ceci suggère que l'anion glutamate apporte à la détection du goût umami une contribution supérieure à celle des cations Na^+ et K^+. Le L-Glu sous forme de glutamate monosodique est couramment utilisé comme exhausteur de goût par l'industrie agro-alimentaire ou pour diminuer la teneur en sel des aliments (Maluly *et al.* 2017). Son utilisation est recommandée à hauteur de 0,1-0,8% par kilogramme ce qui correspond à la quantité naturellement présente dans les tomates ou le parmesan (Beyreuther *et al.* 2007). Pour le MSG, la quantité de sodium apportée est de 12,28 g/100 g, ce qui représente 1/3 de sel comparé au NaCl (39,94 g/100 g). Ainsi, pour un plat cuisiné par exemple de 500 g de riz, le remplacement d'une demi-cuillère à café de NaCl (2,5 g) par une demi-cuillère à café de MSG (2,0 g) réduit le contenu en sel de 37% sans affecter la perception salée (Maluly *et al.* 2017).

Bien que parfois décrié, aucune étude n'a mis en évidence d'effet toxique du MSG. Qu'il soit présent naturellement ou en tant qu'additif, le glutamate est métabolisé et utilisé comme source d'énergie par les entérocytes de la muqueuse intestinale (Reeds *et al.* 2000, Tome 2018). La fraction non métabolisée au niveau du tractus gastro intestinal est métabolisée par le foie générant de l'énergie via le cycle de Krebs ou convertie en urée puis excrétée dans les urines (Burrin and Stoll 2009). On reconnait même aux ingrédients umami des effets bénéfiques pour la santé mis en évidence chez le rat et incluant la réduction des dépôts graisseux, de la prise de poids et des taux plasmatiques de leptine (Kondoh and Torii 2008). La détection de substances umami améliorerait la digestion en stimulant la sécrétion de sucs gastriques, sucs pancréatiques et la synthèse d'insuline ainsi que la quantité de salive

produite. Chez l'animal, il a été montré que des rats obèses ingérant du MSG présentent des taux sanguins de leptine diminués, perdent de la graisse abdominale et prennent moins de poids que le groupe témoin. Cependant, le mécanisme responsable de ces effets n'a pas encore été démontré (Stanska and Krzeski 2016). Les composés umami régulent les fonctions gastro-intestinales (Nakamura *et al.* 2008) et diminuent le risque d'accident vasculaire cérébral et de maladie coronarienne chez l'adulte en réduisant l'apport en sodium dans l'alimentation (Aburto *et al.* 2013, Yamaguchi 1998, Zhang *et al.* 2017). Les propriétés d'exhausteur du goût umami, ainsi que les possibles effets bénéfiques pour la santé des ingrédients umami ont engendrés de nombreuses recherches pour trouver de nouvelles substances umami (Kunishima *et al.* 2000, Masic and Yeomans 2014a, Masic and Yeomans 2014b).

D'autres molécules appartenant à des classes chimiques différentes ont été rapidement mises en évidence notamment pour leur effet synergique en présence du L-Glu. C'est le cas des ribonucléotides comme le guanosine monophosphate (GMP) et l'inosine monophosphate (IMP) (Tseng *et al.* 2005, Yamaguchi 1967, Zhang *et al.* 2008), deux molécules qui possèdent elle-même un goût umami plus prononcé que le L-Glu.

Certains acides organiques ont été rapportés comme contribuant au goût umami. C'est le cas des acides succiniques présents dans le fromage comme par exemple le Comté (Drake *et al.* 2007, Kaneko *et al.* 2006, Park *et al.* 2001, Rotzoll *et al.* 2006, Schlichtherle-Cerny and Grosch 1998, Velisek *et al.* 1978, Zhao *et al.* 2019), mais aussi de la théanine, de l'acide gallique, de la théogalline (Kaneko *et al.* 2006) ou encore de l'acide pyroglutamique (Buckholz and Scharpf 1994).

Quelques dipeptides et tripeptides possédant un L-Glu en position N-terminale ont été décrits comme engendrant un goût umami plus ou moins intense (Grigorov *et al.* 2003). Par exemple, il a été montré que le tripeptide Glu-Ala-Ala présentait un seuil de détection deux fois plus bas que le MSG (Roudot-Algaron 1996). Des mélanges de tripeptides ont d'ailleurs été brevetés par la société Firmenich S.A. pour leur goût umami prononcé (Frerot and Escher 1998). Des études récentes ont montré que quelques molécules peptidiques isolées à partir d'hydrolysats de protéines de poisson, de bouillon de bœuf, de poulet ou d'autres aliments ont un goût umami (Kong *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2016). La récente revue de Zhang Y et collaborateurs rapporte que 52 peptides ont été identifiés comme ayant un goût umami (Zhang *et al.* 2017). Pour autant, vingt d'entre eux montrent des résultats controversés selon les études en termes de goût umami.

Face à une demande d'ingrédients alimentaires naturels en constante croissance, on observe une augmentation des procédés de fermentation, d'hydrolyse et des techniques de préparations séparatives pour isoler et déterminer la structure chimique des peptides d'intérêt

pour le goût umami. En effet, les procédés de fermentation des acides aminés sont une énorme industrie qui représente plus de 5 millions de tonnes par an à l'échelle mondiale, dont 2 millions de tonnes pour le glutamate à lui seul. Initialement isolé à partir du gluten de blé par hydrolyse acide à chaud, la société Ajinomoto a été pionnière dans la production du glutamate par la bactérie gram-positive *Corynebacterium glutamicum* dès 1956 (Hashimoto *et al.* 2012, Zhao *et al.* 2016). Aujourd'hui, de nombreuses équipes tentent de synthétiser des peptides par expression recombinante en bactérie plutôt que chimiquement pour s'affranchir des effets indésirables liés aux résidus des synthèses chimiques. C'est le cas de l'octopeptide Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, au goût umami prometteur produit en bactérie *E. coli*, mais pour lequel les rendements obtenus lors de ces biosynthèses sont encore trop faibles pour une production rentable à l'échelle industrielle (Zhao *et al.* 2018). De plus, bien que l'influence du microbiote de fermentation utilisé pour la protéolyse et l'hydrolyse peptidique soit mieux maîtrisé, la compréhension des activités métaboliques associées à la formation de dérivés peptidiques gustatifs est insuffisante. Une meilleure connaissance des interactions entre les composés gustatifs permettra de développer de nouvelles stratégies de fermentation pour développer des produits alimentaires plus savoureux, moins amers et moins salés, et pourrait fournir de nouveaux ingrédients « propres » pour améliorer le goût d'autres produits alimentaires.

I.5. La saveur amère

Notre capacité à détecter et éviter les molécules amères est associée à un mécanisme préventif contre l'ingestion d'aliments potentiellement toxiques (Glendinning 1994, Meyerhof 2005). Ainsi les seuils de détection observés pour les molécules amères sont souvent inférieurs à des concentrations micromolaires. Par exemple, chez l'Homme, le seuil de perception de la quinine se situe à environ 8 µM. On utilise couramment le dénatonium benzoate (composé amer non toxique de synthèse) comme agent aversif dans les produits ménagers ou cosmétiques dangereux afin de limiter les risques associés à une ingestion volontaire par des enfants. En effet, le dénatonium benzoate est l'une des molécules dont le seuil de perception amère est le plus faible, il est détecté à une concentration de 10 nM, il est perçu comme étant amer à une concentration aussi faible que 50 nM (Klein-Schwartz 1991).

Il existe une très grande diversité de molécules amères, même si toutes les molécules amères ne sont pas toxiques, beaucoup d'entre elles sont très toxiques comme, par exemple, les alcaloïdes. Cependant, toutes les molécules toxiques ne sont pas forcément perçues comme amères (Nissim *et al.* 2017). Un grand nombre de molécules amères naturelles sont issues de plantes qui produisent ces composés chimiques comme moyen de défense contre

les insectes et les herbivores. De plus, il existe aussi de nombreuses molécules synthétiques qui sont amères. Certaines molécules amères peuvent aussi être générées au cours du vieillissement des aliments, lors des processus de réactions de Maillard ou lors des processus de fermentation (Belitz and Wieser 1985, Hofmann 2009).

Ainsi, les acides aminés et les peptides libérés par hydrolyse des protéines lors des processus de transformation des aliments génèrent des composés amers. Parmi les acides aminés acides on trouve le L-Trp, la L-Phe pour les plus amers, suivis de la L-Tyr, la L-Leu, la L-Ile, la L-Arg et la L-Val. Leur amertume est souvent comparée à celle de la caféine. Ainsi il a été montré que le L-Trp et la L-Phe sont respectivement deux et quatre fois moins amers que la caféine. La plupart des acides aminés hydrophobes ont un goût amer et de nombreux peptides formés par ces acides aminés sont également amers (Roudot-Algaron 1996, Schiffman *et al.* 1981). Cela indique que l'amertume d'un peptide est dépendante du caractère hydrophobe des acides aminés qui le constituent. Différents travaux ont tenté de relier le degré d'hydrophobicité des peptides à leur amertume mais cette règle n'est pas généralisable (Cho *et al.* 2004). L'analyse des relations structure-activité de 224 peptides (2 à 14 acides aminés) basée sur les paramètres d'hydrophobicité, le nombre de résidus et la masse moléculaire, a permis de prédire l'amertume de 48 dipeptides et 12 pentapeptides. Cette étude a mis en évidence une forte corrélation entre l'amertume et la présence d'acides aminés hydrophobes (volumineux) en position C-terminale et les acides aminés basiques (volumineux) en position N-terminale (Kim and Li-Chan 2006).

Les études portant sur le goût des peptides sont plus récentes. Elles sont en lien direct avec les procédés de l'industrie agroalimentaire où l'utilisation d'hydrolysats de protéines végétales ou animales est de plus en plus prisée en raison des multiples avantages qu'ils confèrent aux produits alimentaires (texture, enrichissement des apports nutritionnels en protéines, utilisation en tant qu'exhausteurs de goût). Cependant, l'un des principaux obstacles à leur utilisation pouvant réduire leur acceptabilité est le goût amer qu'ils confèrent aux produits finaux. Ainsi la détection, la réduction, voire l'élimination des produits amers dans les hydrolysats est un objectif majeur pour l'industrie alimentaire.

Il a été montré que les goûts amers qui apparaissent au cours de la fermentation des produits traditionnels japonais (miso, sauce soja…) étaient dus aux peptides présents dans les hydrolysats de protéines (Zhao *et al.* 2016). Pour limiter la formation des peptides amers, les industriels utilisent différentes protéases sous forme purifiée, en mélange ou sous forme de ferments. Pour limiter la formation des goûts amers lors de leurs procédés, les industriels jouent sur le degré d'hydrolyse en faisant varier le temps, la température, ou encore en fractionnant les peptides. Des tests d'évaluation sensorielle menés chez l'homme permettent ensuite d'évaluer les hydrolysats obtenus (Humiski and Aluko 2007). Récemment, la mise au point de méthodes de coacervation d'hydrolysats de protéines de pois avec de la pectine de

pomme a permis de réduire l'amertume des produits (Zeeb *et al.* 2018). Une procédure simple de mélange de biopolymères de charge opposée a été utilisée pour générer des coacervats complexes composés de protéines et de pectine à base de plantes. L'hypothèse émise est qu'une diminution de la charge électrique sur les protéines végétales cationiques pourrait réduire leur amertume globale et contribuer ainsi à améliorer l'acceptation sensorielle perçue des dispersions de biopolymères. La réduction du goût amer est donc un vrai challenge pour les industries agroalimentaires et pharmaceutiques (notamment pour les formes pédiatriques des médicaments) qui ont mis en place différentes stratégies physico-chimiques et technologiques pour limiter son impact (Coupland and Hayes 2014, Sun-Waterhouse and Wadhwa 2013).

On notera enfin que certains édulcorants utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour réduire les quantités de sucres ont un goût amer ce qui limite leur utilisation à de faibles concentrations (DuBois and Prakash 2012, Schiffman *et al.* 1995). Les profils temporels de différentes solutions de composés sucrés équivalents à 10% (w/v) de sucrose ont montré que l'acesulfame K, le rébaudioside A et le mogroside sont décrits pour avoir un goût amer important et persistant. L'allulose, l'érythritol, le sorbitol, l'aspartame et le sucralose sont aussi perçus comme amers tout en gardant une prédominance sucrée (Tan *et al.* 2019). Des tests d'expression fonctionnelle des récepteurs à l'amer (récepteurs TAS2R) ont montré que l'amertume peut être directement liée à l'interaction des composés sucrés avec certains de ces récepteurs. Ainsi, le stéviol glycoside active les récepteurs TAS2R4 et TAS2R14 (Acevedo *et al.* 2016, Hellfritsch *et al.* 2012, Singla and Jaitak 2016), la saccharine et l'acésulfame K activent les récepteurs TAS2R43 et TAS2R31 (ex TAS2R44) (Kuhn *et al.* 2004, Pronin *et al.* 2007), le cyclamate active les récepteurs TAS2R1 et TAS2R38 (Meyerhof *et al.* 2010). L'amertume de l'acésulfame K a aussi été corrélée au polymorphisme génétique des récepteurs TAS2R9 et TAS2R31 (Allen *et al.* 2013). De façon surprenante le mélange du cyclamate à de la saccharine permet de réduire l'amertume tout en augmentant l'intensité sucrée. Le mécanisme impliqué dans ce phénomène est lié à l'inhibition des récepteurs TAS2R31 et TAS2R43 par le cyclamate et dans une moindre mesure à l'inhibition du récepteur TAS2R1 par la saccharine (Behrens *et al.* 2017).

I.6. Vers de nouveaux goûts

Depuis quelques années, de nouvelles saveurs ont été proposées comme le goût du gras ou du calcium (kokumi) en lien avec la découverte de récepteurs aux acides gras et au calcium dans le système gustatif.

I.6.1. Le goût du gras

Ainsi, il a été proposé que le goût du gras constitue une nouvelle qualité gustative fondamentale (Besnard *et al.* 2016, Mattes 2009, Running *et al.* 2015). Longtemps, le goût du gras a été réduit à la détection de ses propriétés physiques véhiculées par le nerf trijumeau et de ses propriétés vis-à-vis de l'olfaction dues à ses interactions avec des molécules odorantes associées à ce goût, perçues par la voie rétronasale. Des études menées sur les rongeurs ayant le choix entre une solution témoin et une solution mimant la texture du gras sans son odeur ont montré leur préférence pour la solution contenant des acides gras prouvant ainsi que l'attirance n'est pas simplement due à l'olfaction (Gilbertson and Khan 2014). Les résultats chez l'Homme ont été similaires avec cependant des variabilités interindividuelles importantes selon la sensibilité au gras des sujets.

Un détecteur membranaire, le transporteur d'acide gras CD36, a été découvert dans les bourgeons du goût des papilles caliciformes de souris (Laugerette *et al.* 2005). Ce détecteur possède une forte affinité pour les acides gras libres à longue chaîne et la déletion de son gène (souris KO) confirme son implication dans la perception gustative des acides gras chez les rongeurs (Laugerette *et al.* 2005, Sclafani *et al.* 2007). Chez l'Homme, la détection d'acides gras libres à longue chaîne a également été mise en évidence au niveau de la langue (Chale-Rush *et al.* 2007). Des travaux ont montré que le détecteur CD36 est exprimé au niveau du pôle apical des papilles caliciformes et fongiformes (Simons *et al.* 2011) suggérant comme pour les rongeurs un rôle dans la perception gustative des acides gras. De même les récepteurs couplés aux protéines G : GPR40 et GPR120 (Cartoni *et al.* 2010, Sclafani *et al.* 2007), encore appelés FFA receptor 1 (FFAR1) et FFA receptor 4 (FFAR4) ont été proposés pour intervenir dans la détection du goût du gras car ils sont activés par les acides gras à moyenne et longue chaîne. Des souris KO pour ces récepteurs ont montré une diminution de la réponse nerveuse gustative à la stimulation orale par des acides gras libres et une préférence plus faible pour l'acide oléique et linoléique que les animaux de type sauvage (Cartoni *et al.* 2010). Cependant seul le récepteur GPR120 a été mis en évidence au niveau du bourgeon du goût et de l'épithélium entourant le bourgeon du goût (Galindo *et al.* 2012). Des mécanismes d'activation complexes impliquant CD36, GPR40 et GPR120 semblent mis en jeu et restent encore à élucider.

I.6.2. Le goût du calcium

Le calcium intervient dans de nombreux processus physiologiques. Des carences en calcium sont souvent impliquées dans des problèmes de santé comme l'ostéoporose, les maladies des reins, l'obésité, les maladies cardio-vasculaires et l'hypertension. Le calcium est donc un composant important de nombreuses fonctions cellulaires, il est alors essentiel que

les animaux puissent détecter les sources de ce précieux cation. Bien que le goût du calcium soit difficilement caractérisable, l'être humain est capable de le différencier parmi d'autres types de sels (Lim and Lawless 2005).

Le récepteur pour la détection du calcium est un récepteur appartenant à la classe C des récepteurs couplés aux protéines G : le CaSR (récepteur senseur au calcium extracellulaire). Ce récepteur a été initialement détecté dans les glandes parathyroïdes (Silve *et al.* 2005). Il est également exprimé dans d'autres tissus, tels que le foie, le cœur, les reins et la cavité buccale (Ohsu *et al.* 2010). Le CaSR joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium, et une augmentation de la concentration de calcium dans le sang l'active, entraînant une sécrétion de calcitonine (Ohsu *et al.* 2010). Le CaSR est exprimé dans la cavité buccale, et plus spécifiquement dans les cellules gustatives de type II et de type III (San Gabriel *et al.* 2009). Des études ont suggéré que CaSR pourrait former un dimère avec le récepteur TAS1R3 (sous-unité commune aux récepteurs des goûts sucré et umami) dans les cellules du goût pour détecter le calcium (Tordoff *et al.* 2012). En accord avec cette suggestion, il a été démontré que les cellules exprimant TAS1R3 sont capables de répondre au calcium et non au magnésium de manière dose dépendante (Tordoff *et al.* 2012). De plus, des tests cellulaires ont montré qu'un inhibiteur du goût sucré, le lactisole, dont le site de liaison se trouve dans le domaine transmembranaire de TAS1R3, inhibe l'activation du récepteur TAS1R3 par le calcium (Tordoff *et al.* 2012). Ces données confirment le rôle de la sous-unité TAS1R3 dans la détection du goût du calcium.

I.6.3. La saveur kokumi

La saveur kokumi (en japonais, « la bouche bien remplie ») est une sensation gustative proposée il y a environ 25 ans au Japon (Ueda *et al.* 1990, Ueda *et al.* 1997). Les molécules de kokumi n'ont pas de goût en elles-mêmes, mais elles synergisent d'autres saveurs telles que l'umami, le sucré et le salé. La molécule de référence de la sensation de kokumi est le glutathion (GSH) (Ueda *et al.* 1990, Ueda *et al.* 1997). Récemment, le récepteur CaSR a été montré comme participant à la détection du goût kokumi chez l'homme. En effet, il a été démontré que les agonistes du CaSR sont capables de provoquer le goût de kokumi chez l'homme et à l'inverse les molécules qui activent le CaSR dans des tests cellulaires génèrent bien un goût kokumi (Ohsu *et al.* 2010). En testant différents agonistes de ce récepteur, il a été découvert une molécule provoquant la saveur kokumi à faible concentration: le tripeptide γ-Glu-Val-Gly (Amino *et al.* 2016, Maruyama *et al.* 2012, Ohsu *et al.* 2010). Ce tripeptide a récemment été autorisé comme additif alimentaire.

I.7. Perception trigéminale (astringence, frais et épicé)

La perception trigéminale est une sensibilité qui n'est pas associée à un organe sensoriel spécialisé. Cette sensibilité chimique correspond à l'activation du nerf trijumeau qui innerve toutes les muqueuses du visage. La perception trigéminale permet de détecter le piquant du poivre, le brûlant du piment (capsaïcine), le frais du menthol ou encore le pétillant des boissons gazeuses (CO_2). La perception trigéminale permet également la détection de l'astringence générée par exemple par certains vins ou par le thé (riches en polyphénols).

De nombreuses études tentent d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires mises en jeu dans la perception trigéminale. Cela a souvent été réalisé en initiant des travaux à partir des molécules responsables de ces sensations (Gerhold and Bautista 2009). En construisant une banque d'ADNc à partir d'ARN messager dérivé des neurones du ganglion spinal, les travaux de Caterina et collaborateurs ont permis d'identifier le transient receptor potential vanilloid (TRPV1) comme récepteur potentiel de la capsaïcine (Caterina *et al.* 1997). En utilisant la même stratégie, le canal ionique transient receptor potential melastatin TRPM8 a été mis en évidence comme la cible moléculaire du menthol (McKemy *et al.* 2002, Yin and Wu 2018).

L'astringence est souvent décrite comme une perception tactile avec une sensation de dessèchement, de rugosité ressentie dans la bouche. Les tannins sont les principaux polyphénols végétaux responsables de l'astringence et sont connus pour leur capacité à se lier et à précipiter les protéines. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore parfaitement élucidés. Parmi les hypothèses, la sensation d'astringence serait liée à une action mécanique directe des tannins avec la pellicule mucosale qui recouvre la langue conduisant à une perte de lubrification et une augmentation des forces de friction à la surface de la muqueuse orale. D'autres hypothèses proposent que les Protéines Riches en Proline (PRP) présentes dans la salive joueraient un rôle de protection et de prévention de l'astringence en captant les tannins (Canon *et al.* 2018). Les travaux de Schobel et collaborateurs menés *in vivo* chez l'Homme et les mesures par imagerie calcique réalisées chez la souris sur des neurones issus des ganglions trigéminaux stimulés par l'epigallocatechine gallate, ont permis d'émettre l'hypothèse de l'intervention d'un récepteur couplé aux protéines G (Jiang *et al.* 2014, Schobel *et al.* 2014).

II. Anatomie du système gustatif périphérique

La sensation gustative est perçue grâce à des récepteurs situés dans les bourgeons gustatifs. La cavité orale chez l'Homme contient en moyenne 5000 bourgeons gustatifs qui sont, soit regroupés dans des papilles gustatives, soit directement présents au sein de la cavité buccale, sur le voile du palais, l'épiglotte, le pharynx et le larynx (Breslin and Huang 2006, Miller and Spangler 1982). L'activation des détecteurs du goût par des molécules sapides entraîne une dépolarisation de la cellule gustative qui va libérer un neurotransmetteur à proximité des neurones situés à la base des cellules. Ces neurones activés vont ensuite propager l'information gustative vers plusieurs relais, jusqu'au cerveau.

II.1. La langue, les papilles gustatives

Il existe quatre types de papilles gustatives classées selon leur morphologie (**Figure 2**). Les plus nombreuses sont les papilles filiformes présentes sur toute la surface de la langue qui lui donnent son aspect rugueux. Elles ne contiennent pas de bourgeon du goût mais elles participent à la perception gustative en fournissant des informations sur la texture des aliments.

Les papilles fongiformes sont réparties sur les deux tiers antérieurs de la langue (Chandrashekar *et al.* 2006). Elles possèdent un petit nombre de bourgeons du goût (1 à 3) positionnés dans leur partie apicale.

Les papilles foliées forment de petits sillons sur les côtés de la région postérieure de la langue. Elles contiennent un nombre variable de bourgeons du goût allant d'une dizaine à une centaine (Witt *et al.* 2003).

Sur le tiers postérieur de la langue se situent les papilles caliciformes caractérisées par leur forme en calice. Elles possèdent une dépression circulaire connectée à la base à des glandes salivaires, appelées glandes de Von Ebner, qui produisent et sécrètent différentes enzymes dont des lipases et l'anhydrase carbonique VI (Hamosh 1990, Leinonen *et al.* 2001) ainsi que certaines protéines de transport (lipocalines) (Kock *et al.* 1994). Chez l'Homme, on dénombre une dizaine de papilles caliciformes formant un arc et contenant environ 250 bourgeons du goût, alors que les rongeurs n'en possèdent qu'une seule en position centrale.

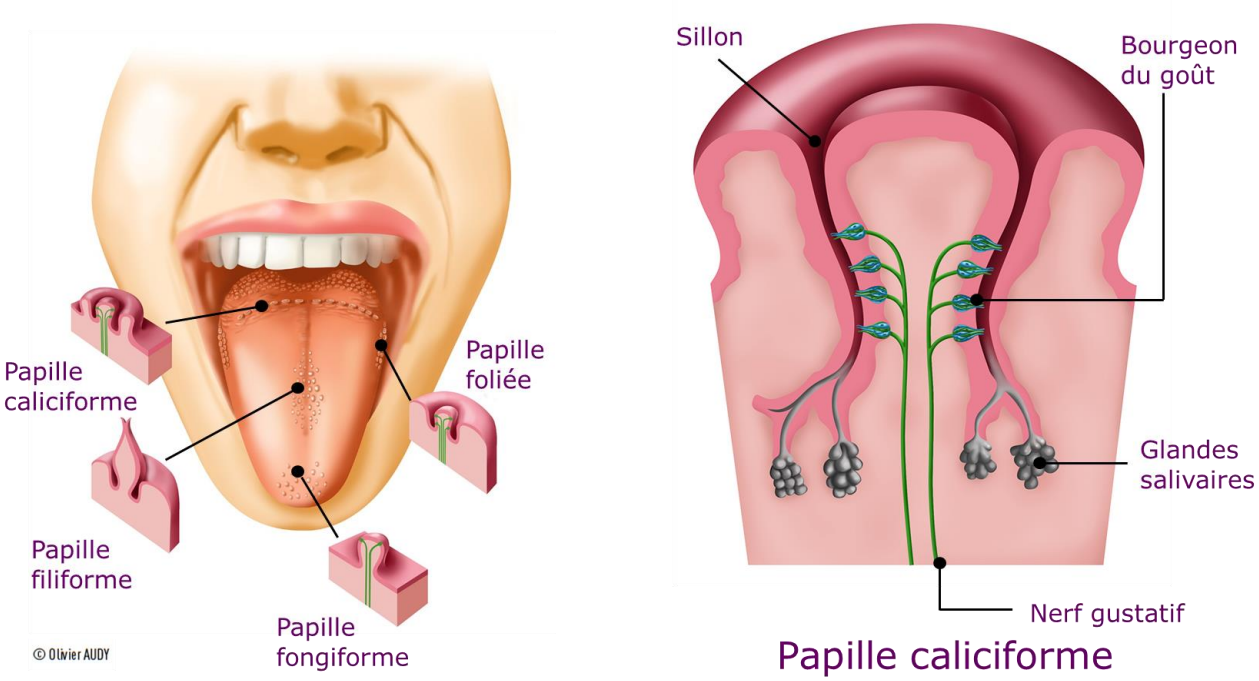

Figure 2 : Anatomie du système gustatif périphérique.

La langue est recouverte de quatre types de papilles : caliciformes, foliées, fongiformes et filiformes. Seules les trois premières contiennent des bourgeons gustatifs. Chaque bourgeon renferme des cellules gustatives dont les microvillosités affleurant par le pore gustatif portent les récepteurs du goût (d'après Science & Santé 2016, n°32, Inserm, Image Oliver AUDY).

II.2. Les bourgeons du goût

Les bourgeons du goût sont le siège de la détection des molécules sapides (**Figure 3**). Ce sont des structures microscopiques (50 µm de diamètre) constituées de 50 à 100 cellules gustatives reliées entre elles par des jonctions serrées (Breslin and Huang 2006). Une ouverture étroite, appelée pore gustatif, connecte les extrémités apicales des cellules gustatives au milieu extérieur (Roper 1992). Ainsi, lors de la prise alimentaire, les molécules sapides dissoutes dans la salive vont entrer dans les bourgeons gustatifs via ce pore. Elles seront ensuite détectées par les récepteurs ancrés dans la membrane des cellules gustatives.

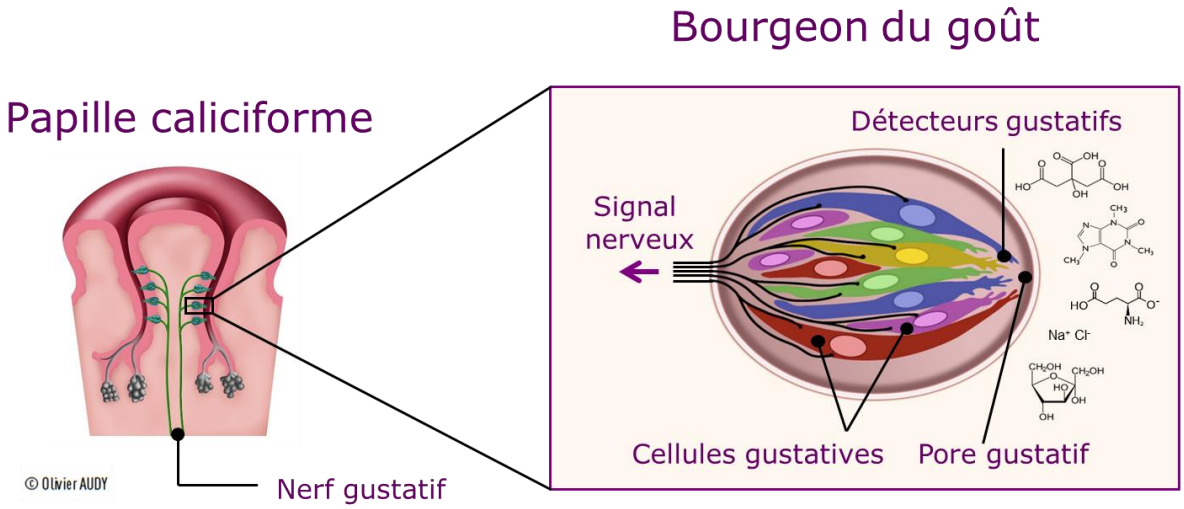

Figure 3 : Organisation d'un bourgeon du goût.

Au sein de la papille gustative, les cellules gustatives sont organisées en un paquet sous la forme d'un oignon. L'extrémité apicale des cellules gustatives forme le pore gustatif en contact avec la salive et les molécules sapides. Sur la partie basale du bourgeon gustatif, les fibres nerveuses afférentes forment des synapses avec des cellules spécifiques et se projettent vers le système nerveux périphérique (d'après Science & Santé 2016, n°32, Inserm, Image Oliver AUDY).

II.3. Les cellules gustatives

Les cellules gustatives ont une durée de vie très courte (environ 10 jours) et sont remplacées continuellement (Farbman 1980). On distingue quatre types principaux de cellules gustatives, définis selon la forme de la cellule, son positionnement dans les bourgeons gustatifs et son apparence en microscopie électronique (Roper 2013) (**Figure 4**).

Les cellules de type I (glial-like cell) sont des cellules de forme allongée et présentant de longues microvillosités à leur pôle apical. Elles sont parfois appelées « cellules sombres » du fait de leur apparence en microscopie. Elles sont les plus importantes et représentent entre 50-60% des cellules qui composent le bourgeon (Chaudhari and Roper 2010). Elles jouent un rôle de soutien. Les cellules de type I expriment un transporteur du glutamate et de l'aspartate appelé GLAST (Lawton *et al.* 2000), ainsi qu'une ecto-ATPase, la nucléoside triphosphate diphosphohydrolase-2 qui hydrolyse les composés 5′-triphosphates extracellulaires comme l'ATP extracellulaire, limitant ainsi leur diffusion (Bartel *et al.* 2006). Les cellules de type I de souris présentent les mêmes propriétés que les cellules gliales du système nerveux. Ces cellules pourraient donc jouer plus qu'un rôle de soutien (Bigiani 2001). Bien qu'elles possèdent à la fois de longues microvillosités étendues à la surface du pore gustatif et qu'elles soient, chez certaines espèces, capables de faire des synapses avec des neurones, il reste encore incertain que ces cellules soient impliquées dans la détection et la transduction du signal gustatif. Les cellules de type I sont sensibles au goût salé et impliquées dans les

courants ioniques. En effet, deux études ont montré qu'elles expriment également un canal au sodium épithélial (ENaC) sensible à l'amiloride (Shigemura *et al.* 2008, Vandenbeuch *et al.* 2008) qui est le principal canal impliqué dans la détection du goût salé (Chandrashekar *et al.* 2010).

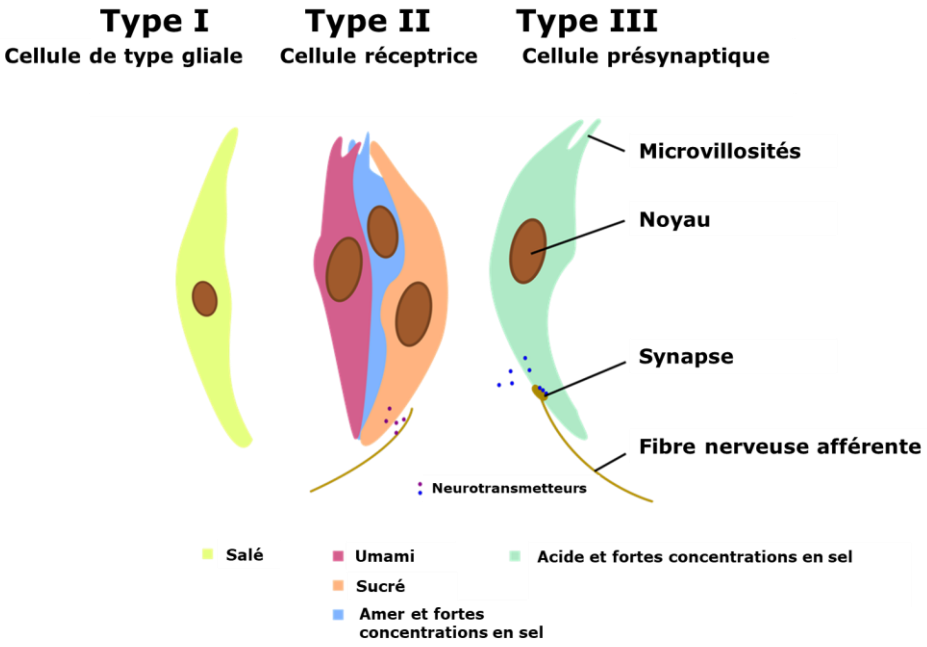

Figure 4 : Les principaux types de cellules gustatives.

Les bourgeons gustatifs contiennent différents types de cellules gustatives : les cellules de type I (glial-like cell), les cellules de type II (taste receptor cells) et les cellules de type III (presynaptic cells). Chaque type de cellule est capable de répondre à une modalité de goût et exprime les récepteurs impliqués dans cette détection. Seules les cellules de type III forment des synapses avec des fibres nerveuses afférentes. Les autres types de cellules communiquent via la sécrétion d'un certain nombre de neurotransmetteurs dans leur environnement reçu par les fibres nerveuses afférentes sans formation de synapse.

Les cellules de type II (receptor cell), appelées aussi « cellules claires », présentent des microvillosités plus courtes que les cellules de type I. Elles constituent environ 35% des cellules totales du bourgeon. Elles portent les récepteurs gustatifs au goût amer, sucré et umami qui appartiennent tous à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). On retrouve ainsi les récepteurs hétérodimériques TAS1R1/TAS1R3 et TAS1R2/TAS1R3 impliqués respectivement dans la perception des composés umami et sucrés (Hoon *et al.* 1999) ainsi que la famille des récepteurs à l'amer appelés TAS2R (Adler *et al.* 2000, Matsunami *et al.* 2000). Ces cellules expriment également des protéines impliquées dans les voies de transduction des signaux gustatifs comme la phospholipase C β2 (PLCβ2) (Clapp *et al.* 2004) le canal ionique TRPM5 ou transient receptor potential melastatin 5 (Perez *et al.*

2002), l'IP3R3 ou récepteur 3 à l'inositol 1,4,5-triphosphate (Clapp *et al.* 2001) et la protéine G appelée α-gustducine (Yang *et al.* 2000b). Elles ne forment pas de synapses conventionnelles avec les fibres nerveuses mais communiquent via la libération d'ATP qui agit comme neurotransmetteur et exciterait les cellules de type III et les fibres sensibles afférentes (Finger *et al.* 2005, Huang *et al.* 2007).

Les cellules de type III (presynaptic cell), aussi appelées cellules intermédiaires transfèrent le signal gustatif via la formation de synapses avec les fibres afférentes des nerfs gustatifs (Murray 1986, Roper 2007). Elles sont directement stimulées par le goût acide et indirectement par le goût sucré, amer et l'umami. Ces cellules semblent intégrer de multiples stimuli générés dans le bourgeon gustatif. Il a été montré que ces cellules possèdent de nombreux composants synaptiques tels que la SNAP25, synaptosomal-associated protein 25 kDa, protéine impliquée dans la fusion des vésicules synaptiques à la membrane durant l'exocytose (Yang *et al.* 2000a), la NCAM ou Neural Cell Adhesion Molecule (Nelson and Finger 1993), la sérotonine (Yee *et al.* 2001) et des enzymes participant à la synthèse de l'acide γ-aminobutyrique (GABA) (DeFazio *et al.* 2006, Trubey *et al.* 2006). Les cellules de type III expriment également les récepteurs purinergiques P2X2 et P2X3 grâce auxquels elles communiquent avec les cellules de type II via l'ATP (Finger *et al.* 2005). Les cellules présynaptiques libèrent différents neurotransmetteurs comme la sérotonine, la norépinephrine et le GABA. Les neurotransmetteurs ainsi libérés vont activer les neurones situés à la base des cellules gustatives et propager l'information gustative vers plusieurs relais, jusqu'au cerveau.

Enfin, les précurseurs de cellules gustatives, autrefois appelées cellules de types IV, constituent un petit groupe hétérogène de cellules situées vers la base de la structure des bourgeons gustatifs. On pensait initialement que ces cellules étaient les cellules progénitrices exclusives des types différenciés de cellules gustatives présentes dans le bourgeon du goût. En fait, des travaux récents chez la souris ont montré la présence de la protéine Sonic Hedgehog (SHH) dans de multiples types cellulaires qui entourent le bourgeon du goût. La protéine SHH qui joue un rôle clef dans la régulation de l'organogénèse et plus particulièrement dans l'orientation des cellules souches et leur différenciation a été mise en évidence dans plusieurs types de cellules épithéliales qui entourent le futur bourgeon du goût et contribuent à son renouvellement (Castillo *et al.* 2014, Liu *et al.* 2013). En effet, des études par immuno-marquages ont permis de mesurer la durée de vie et le renouvellement des différents types cellulaires du bourgeon du goût et ont mis en évidence des durées de vie différentes des types de cellules gustatives. Ainsi la demi-vie des cellules de type II est estimée

à 8 jours alors que les cellules de type III, plus longues à se différencier survivraient jusqu'à 44 jours (Perea-Martinez *et al.* 2013).

II.4. Neurotransmetteurs

Du fait que seules les cellules de type III possèdent des synapses conventionnelles pour activer les fibres nerveuses afférentes, on a longtemps cru que les cellules de type II et de type III communiquaient entre elles via des jonctions de type gap-junction. En fait, le système de transmission du signal entre cellules est bien plus complexe. Les cellules gustatives communiquent via la libération de neurotransmetteurs qui excitent les cellules de type III et les fibres sensibles afférentes. Les neurotransmetteurs ainsi libérés activent les neurones situés à la base des cellules gustatives et propagent l'information gustative vers plusieurs relais, jusqu'au cerveau.

Au moins cinq neurotransmetteurs ont été identifiés au niveau des papilles gustatives comme l'ATP, la sérotonine (5-HT), l'acide γ-aminobutirique (GABA), l'acétylcholine et la noradrenaline (Roper and Chaudhari 2017). De plus plusieurs peptides fonctionnant comme des hormones ou des neuromodulateurs sont capables d'interagir avec le système gustatif en influençant la sensibilité des papilles gustatives (Calvo and Egan 2015). C'est notamment le cas des hormones glucagon et glucagon-like peptide 1 et 2 (GLP-1 et GLP-2), du peptide vaso intestinal (VIP peptide), de la cholecystokinine (CCK) et du neuropeptide Y (NPY) qui sont synthétisés par les cellules gustatives. On a pu mettre en évidence l'expression de la ghréline, hormone intervenant dans la régulation de l'appétit dans les quatre types cellulaires et l'expression de la galanine, hormone intervenant dans la régulation de la prise alimentaire, dans les cellules de type II et de type III (Dotson *et al.* 2013). Les récepteurs de la vasopressine, hormone de régulation de l'appétence pour le sel et de la natriurèse (teneur en sodium de l'urine) sont présents dans les cellules de type I qui permettent de détecter la saveur salée. Les récepteurs de la leptine, hormone impliquée dans la régulation de la dépense énergétique, le poids corporel, la masse grasse et le comportement alimentaire, sont exprimés dans les cellules de type II. L'ensemble de ces données montrent une interaction entre les différents types de cellules gustatives via différentes voies de régulation hormonale qui assure le maintien et la régulation de l'homéostasie cellulaire au niveau des bourgeons du goût.

II.5. Nerfs gustatifs

Trois branches principales des nerfs crâniens assurent l'innervation périphérique des bourgeons gustatifs : la corde du tympan, (une branche du nerf facial VII), le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf vague (X) (**Figure 5**).

Les bourgeons du goût situés dans les papilles foliées et caliciformes présentes sur la partie postérieure de la langue sont innervés par le nerf glossopharyngien. Ce nerf transmet à la fois des informations somesthésiques et chimiosensorielles (gustatives) alors que la corde du tympan véhicule uniquement les informations gustatives. La corde du tympan innerve les papilles fongiformes et foliées situées sur les deux tiers antérieurs de la langue. On notera que le nerf trijumeau (V) assure la transmission des sensibilités à la douleur, thermique et tactile via sa branche linguale.

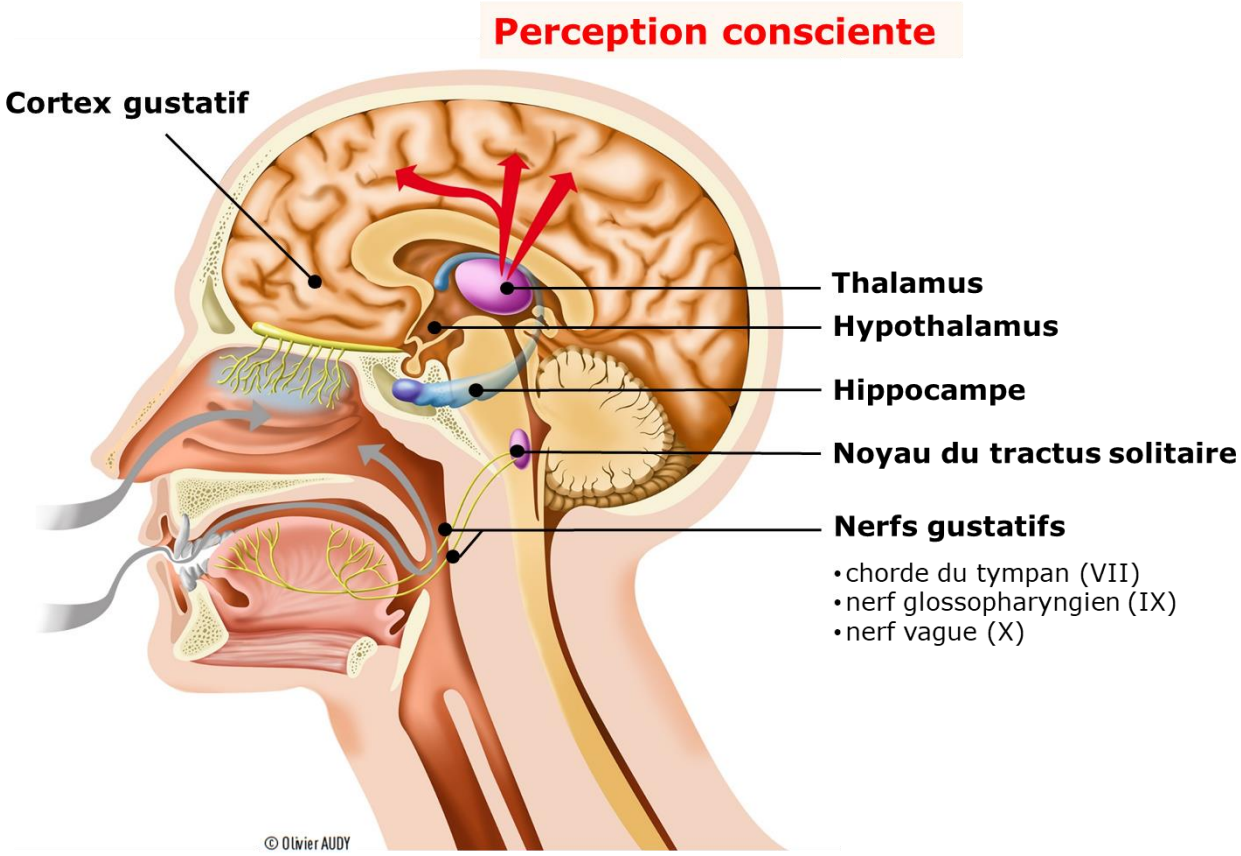

Figure 5 : Neuroanatomie du système gustatif.
Dans la cavité buccale, la langue est innervée par quatre branches principales de nerfs crâniens : la corde du tympan, (une branche du nerf facial VII), le nerf glossopharyngien (IX), le nerf vague (X) et le nerf trijumeau (V) (d'après Margolskee, 2005). Les nerfs gustatifs se projettent dans le système nerveux central et le cortex gustatif à travers une structure spécifique du tronc cérébral appelée noyau du tractus solitaire (d'après Science & Santé 2016, n°32, Inserm, Image Oliver AUDY).

Les informations véhiculées par les différentes fibres afférentes se projettent ensuite vers un premier relais gustatif appelé noyau du faisceau solitaire (NFS) ou noyau du tractus solitaire (NTS) situé dans le bulbe. Le NFS est le centre de convergence des afférences intéroceptives viscérales et des trois modalités sensorielles que sont l'olfaction, la gustation et la somesthésie. Ce nerf est projeté ensuite au niveau cortical dans la partie parvo-cellulaire du thalamus ventro-postéromédian (VPMpc) ipsilatéral (Travers and Norgren 1995) puis dans le lobe pariétal et l'opercule de l'insula au niveau de l'aire gustative corticale. Il a été montré par imagerie par résonance magnétique, que la perception hédonique de certaines molécules sapides implique l'hypothalamus latéral et le complexe orbito-frontal (Rolls 1997).

II.6. Le codage de l'information gustative

Actuellement, le débat est ouvert pour déterminer comment les informations provenant des papilles gustatives sont transmises au système nerveux central et, en particulier, comment les signaux permettent de discriminer les goûts sucré, acide, salé, amer et umami. Les mesures d'expression des récepteurs du goût dans les papilles gustatives ont montré que les récepteurs TAS2R, qui détectent les stimuli amers, ne se trouvent pas dans les cellules exprimant les récepteurs TAS1R, qui détectent les stimuli sucrés ou umami (Nelson *et al.* 2001).

Le codage gustatif fait encore l'objet de deux hypothèses. La première hypothèse dite des lignes dédiées ou labelled-line model, stipule que la modalité gustative reconnue par les cellules gustatives ne pourrait être relayée jusqu'au cerveau que par des fibres nerveuses spécifiques à chaque qualité gustative (Frank 1973, Liman *et al.* 2014, Reiter *et al.* 2015). Cette hypothèse est étayée par les résultats de travaux menés sur souris qui ont mesurés la réponse préférentielle de fibres afférentes individuelles à une seule modalité gustative.

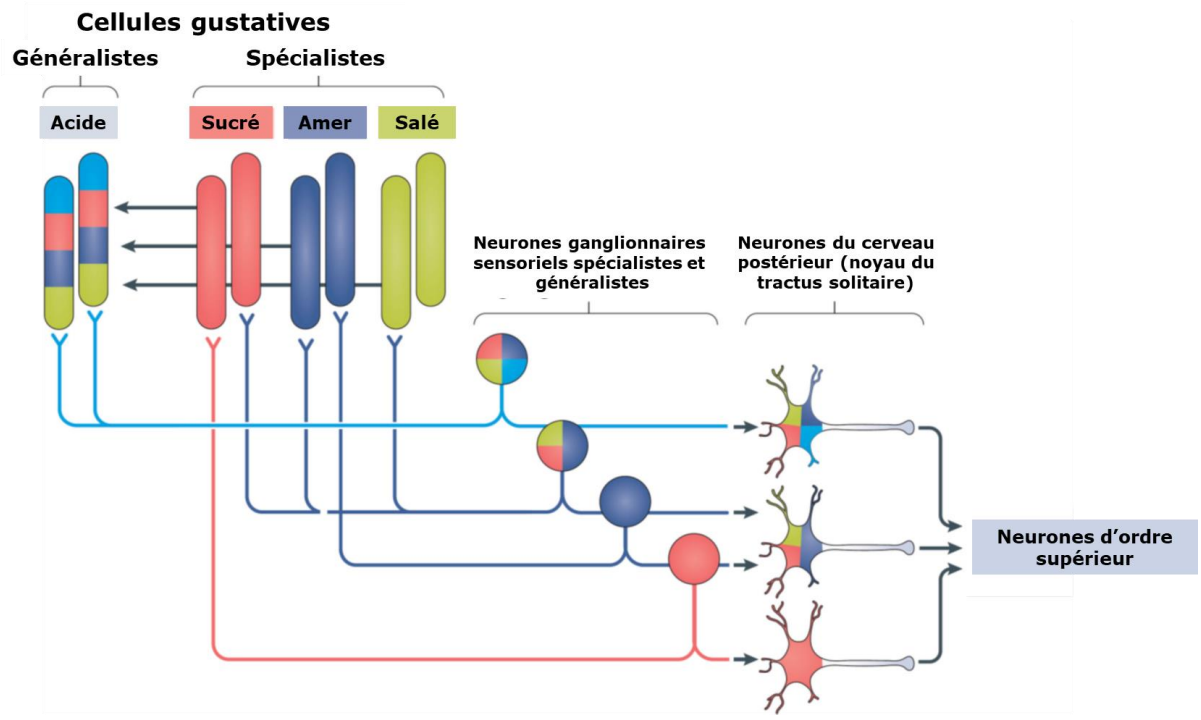

Figure 6 : Modèle de codage combinatoire de l'information gustative.

Les cellules de type II des bourgeons gustatifs sont généralement accordées sur une qualité gustative (par exemple, amère, sucrée ou salée, ici l'umami a été omis pour plus de clarté): elles sont dites «spécialistes». Les cellules de type III détectent les goûts acides et répondent également à d'autres stimuli gustatifs via une communication cellule à cellule (paracrine) au sein du bourgeon gustatif (représenté par les flèches situées entre les cellules du bourgeon gustatif). Ainsi, les cellules de type III peuvent être qualifiées de «généralistes». Certains neurones ganglionnaires afférents reçoivent des informations de cellules gustatives qui répondent à une qualité gustative unique et seraient donc des neurones spécialisés. D'autres neurones ganglionnaires afférents reçoivent les informations de nombreuses cellules gustatives ou de type III et sont donc des neurones «généralistes» multi-sensibles. Les cellules ganglionnaires sensorielles convergent vers les neurones du cerveau postérieur dans le noyau du tractus solitaire puis transmettent l'information à d'autres neurones vers le cortex gustatif (d'après Roper et Chaudhari, 2017).

Dans la seconde hypothèse dite de codage combinatoire l'information qualitative déclenchée par un stimulus gustatif serait encodée par l'activation de plusieurs fibres afférentes différentes (Carleton *et al.* 2010, Liman *et al.* 2014, Reiter *et al.* 2015) (**Figure 6**). La combinaison globale de ces fibres activées encoderait alors la qualité gustative, comme par exemple le sucré. Un tel codage combinatoire est établi pour caractériser la reconnaissance des odeurs dans le système olfactif. Ainsi, chaque cellule gustative répond à un seul type de stimulus mais une même fibre afférente pourrait véhiculer plusieurs modalités gustatives. Cette hypothèse est soutenue par un grand nombre d'expérimentations en électrophysiologie réalisées sur rongeurs qui ont révélé l'existence de neurones hautement réglés, également appelés « spécialistes », qui ne répondent qu'aux stimuli d'une seule qualité gustative. Cependant, ces mêmes enregistrements révèlent également l'existence de neurones appelés « généralistes » qui répondent à deux qualités gustatives différentes ou

plus. Les proportions relatives de ces neurones spécialistes et généralistes varient considérablement en fonction de l'espèce, du choix des stimuli présentés et de la concentration du stimulus. De plus, souvent, un stimulus gustatif est plus efficace pour un neurone donné mais cette propriété n'est pas toujours fixe. Parfois l'augmentation de la concentration de la molécule sapide convertit les neurones spécialistes en neurones largement réactifs (Wu *et al.* 2015). De même, les neurones activés par de faibles concentrations de stimulus acquièrent une modalité gustative différente à des concentrations plus élevées. Ces observations sont en contradiction avec le modèle de codage du goût de la ligne dédiée. En plus de ce codage spatial, il a été montré que la qualité gustative serait codée de manière temporelle (Lemon and Katz 2007).

III. Les récepteurs du goût

III.1. Les détecteurs au salé et à l'acide

III.1.1. Salé

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de la détection du goût salé ne sont pas encore bien connus. Il existe des différences importantes entre les espèces dans la détection du goût salé, ce qui rend difficile la généralisation des résultats obtenus chez les rongeurs pour l'homme (Liman *et al.* 2014). Les recherches sur le goût salé ont été facilitées par les propriétés de l'amiloride, un composé diurétique dérivé de la guanine qui agit comme un inhibiteur du goût salé chez le rongeur et l'homme (Halpern 1998). Chez les rongeurs, l'application d'amiloride sur la langue inhibe la détection du NaCl à faibles concentrations, alors que l'homme est beaucoup moins sensible à l'amiloride et conserve une certaine sensibilité au NaCl (Schiffman *et al.* 1983). L'amiloride n'inhibe pas la détection du sel aux fortes concentrations. Il a été montré que le sel à faible concentration était perçu par les cellules gustatives de type I (Vandenbeuch *et al.* 2008) alors que le sel à haute concentration active les cellules gustatives de type III et de type II amer (Oka *et al.* 2013, Roper 2015).

Du point de vue moléculaire il a été montré que l'amiloride est un puissant inhibiteur du canal de transport sélectif aux ions Na^+ appelé canal au sodium épithélial (ENaC). Cette observation suggère le rôle de ce récepteur dans la perception du salé. Le canal ENaC est formé de trois sous-unités homologues, appelées α, β et γ qui sont encodées par 3 gènes distincts (Oka *et al.* 2013, Roper 2015). La structure précise du canal ENaC humain a été résolue par cryo-EM en 2018 et a confirmé l'assemblage du canal ionique sous la forme d'un hétérotrimère constitué des trois chaînes α, β et γ (Noreng and Bharadwaj 2018). Les trois sous-unités s'associent côte à côte, selon un mécanisme encore inconnu, pour former un tube étroit à travers la membrane et un grand domaine extracellulaire (**Figure 7**). Vues de l'extérieur

de la cellule, les sous-unités forment un anneau étroit orienté dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Noreng and Bharadwaj 2018). Le rôle de l'ENaC dans la perception du goût salé est également appuyé par les résultats obtenus sur des souris *ENaC*$^{-/-}$ KO chez lesquelles on observe une perte totale d'attraction et de réponse au goût salé (Chandrashekar *et al.* 2010). Ces auteurs ont étudié plus en avant le phénomène lié aux concentrations élevées en sel et ont conclu que, bien que l'amiloride n'inhibe pas la réponse aux concentrations élevées en sel, il supprimait complètement le potentiel du récepteur transitoire au melastatine 5 (TRPM5) et PKD2L1, suggérant leur implication possible dans le mécanisme de transduction de la détection de sel à haute concentration (Chandrashekar *et al.* 2010). Cela est conforme à l'observation précédente selon laquelle des concentrations élevées de sel sont perçues par les cellules gustatives de type III et de type II qui expriment respectivement PKD2L1 et TRPM5 (Oka *et al.* 2013, Vandenbeuch *et al.* 2008).

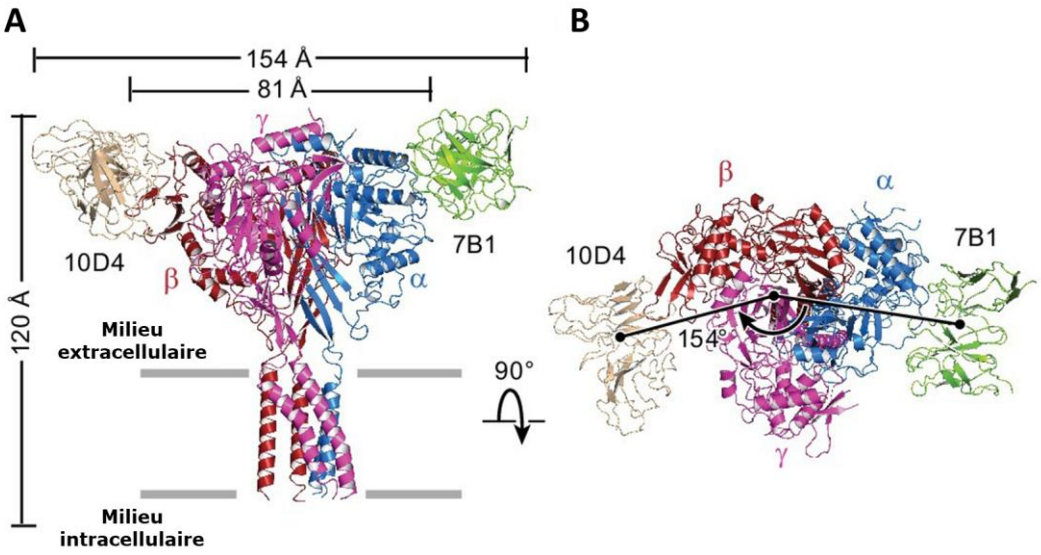

Figure 7 : Structure du canal ionique ENaC humain résolue par cryo-EM.
Les sous-unités α, β, et γ sont colorés respectivement en bleue, rouge et magenta. Les anticorps monoclonaux de souris 7B1 (en vert) et 10D4 (en beige) sont dirigés contre les épitopes ENaC et sont utilisés pour stabiliser la structure (d'après Noreng et al., 2018).

Peu de choses sont connues sur l'influence réelle de modulateurs et des anions associés (contre ions) sur l'activation du récepteur au salé. De plus, dans certains cas, le renforcement de la perception du salé semble plutôt expliqué par une action inhibitrice sur les récepteurs d'autres saveurs (amertume…). La transduction du signal via d'autres mécanismes indépendants du canal ENaC existe donc mais reste à découvrir, tout comme l'identité exacte des types cellulaires capables de répondre aux stimuli salés (Roper 2015).

III.1.2. L'acide

Le mécanisme de détection de la saveur acide a été difficilement élucidé et de nombreux canaux et récepteurs candidats ont été proposés (Huang *et al.* 2006). Il est difficile d'étudier la transduction du goût acide et sa réponse neuronale car le système trijumeau qui innerve la langue est également sensible aux stimuli acides (Liman *et al.* 2014).

Dans un premier temps, il a été montré que le canal ionique PKD2L1, canal non sélectif de transport de cations, était nécessaire à la détection du goût acide au niveau neuronal. Ce canal ionique fait partie de la famille des TRP. Les marquages immunohistochimiques des papilles de souris ont montré que PKD2L1 n'est exprimé que dans les cellules gustatives de type III et plus particulièrement au niveau de l'extrémité apicale des pores du bourgeon du goût. Les souris *PKD2L1*$^{-/-}$ perdent leur capacité à réagir à l'acide citrique, l'acide chlorhydrique et l'acide tartrique ce qui laisse supposer que PKD2L1 joue un rôle dans la détection de ces acides (Huang *et al.* 2006). La protéine PKD1L3 est aussi soupçonnée d'intervenir dans la détection du goût acide. Les protéines PKD1L3 et PKD2L1 sont co-exprimées au niveau des cellules gustatives. Des tests d'activité fonctionnelle réalisés sur cellules hétérologues ont montré que la co-expression de PKD1L3 et PKD2L1 entraîne une réponse des cellules à divers acides mais pas à d'autres classes de substances gustatives. Cette co-expression semble donc nécessaire à leur activité fonctionnelle (Ishimaru 2015, Ishimaru *et al.* 2006).

Des études supplémentaires menées sur les papilles caliciformes (Chang *et al.* 2010) et les papilles fongiformes (Bushman *et al.* 2015), ont confirmé que les cellules exprimant PKD2L1 sont effectivement impliquées dans la détection du goût acide. Cependant, les auteurs proposent que la transduction gustative ferait intervenir un autre mécanisme de détection qui impliquerait un canal à un proton sensible au zinc. Des études récentes ont aussi mis en évidence l'intervention d'autres canaux ioniques pouvant notamment intervenir dans la réponse des cellules à l'acide. C'est notamment le cas du canal potassique KIR2.1 sensible au zinc dont la réponse aux acides faibles suggère un mécanisme d'amplification du signal intracellulaire (Roper and Chaudhari 2017, Ye *et al.* 2016).

Récemment, l'analyse transcriptomique comparative des cellules gustatives de souris sensibles ou non au zinc, a permis d'identifier la protéine Otopetrin1 (OTOP1) comme un candidat intervenant dans la détection du goût acide (Montell 2018, Tu and Cooper 2018). La conservation évolutive de la famille de gène *Otop* et sa distribution tissulaire étendue suggèrent un rôle important des canaux à protons en physiologie et physiopathologie (Tu and Cooper 2018). Teng et collaborateurs ont montré que les souris chez lesquelles Otop1 est génétiquement inactivé ont une réponse cellulaire nerveuse et gustative aux acides sévèrement diminuée, indiquant que Otop1 fonctionne comme un récepteur du goût acide

(Teng *et al.* 2019). La récente résolution de la structure cristalline de Otop1 du zebrafish (44% d'identité avec OTOP1 humaine) et Otop3 du poulet (56 % d'homologie avec OTOP3 humaine) offre un point de départ pour les études mécanistiques sur les otopétrines (Saotome and Teng 2019). Les structures montrent qu'Otop1 et Otop3 sont des homodimères de forme cuboïde ayant des dimensions d'environ 70 × 50 × 50 Å et que la quasi-totalité de leur masse ordonnée réside dans la membrane. Une seule sous-unité d'otopétrine peut être divisée en deux moitiés, les domaines amino-terminal (N) et carboxy-terminal (C). Dans l'agencement homodimérique, les domaines N et C de deux sous-unités occupent quatre quadrants entourant un axe central, ce qui entraîne une organisation pseudotétramérique (**Figure 8**). Un tunnel caverneux contenant des lipides et / ou des cholestérols coïncide avec le double axe central de Otop1 et Otop3. Les interfaces inter- sous-unités, et intra-sous-unités entre les domaines N- et C-terminaux semblent stabiliser l'ensemble de l'assemblage (Saotome and Teng 2019).

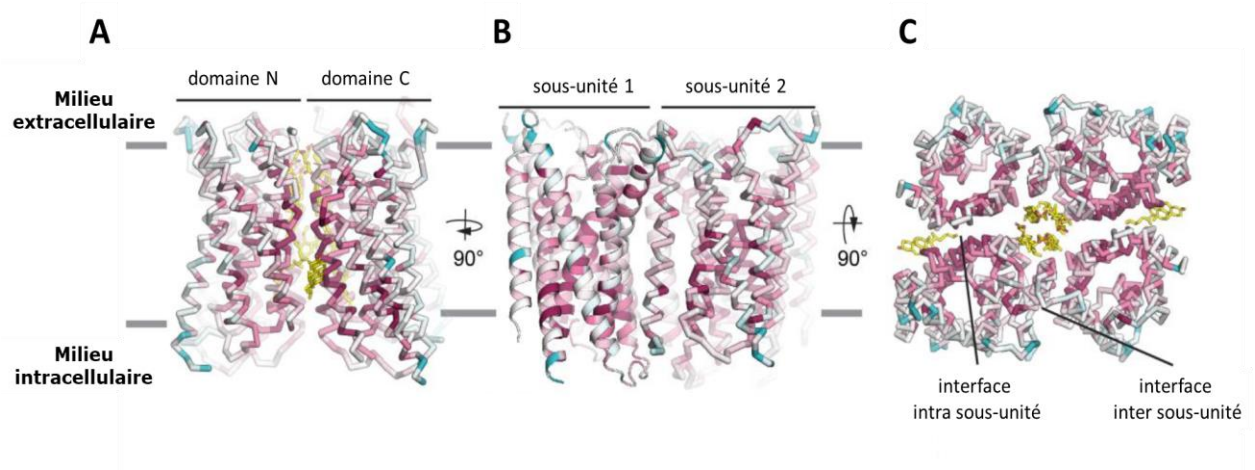

Figure 8 : Structure du canal ionique Otop1 résolue par cryo-EM.
Le détecteur OTOP1 est exprimé dans les cellules gustatives de type III et participe à la détection du goût acide. C'est un dimère formant un canal dans lequel chaque sous-unité est constituée de 12 hélices α transmembranaires. (A) et (B) vues de face ; (C) vue de dessus (d'après Saotome et al, 2019).

III.2. Les récepteurs TAS1Rs

Pour détecter la saveur sucrée, amère et umami, l'Homme est équipé d'une classe de détecteurs appelés Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG).

Les RCPG représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez les eucaryotes. Ils sont codés par plus de 800 gènes dans le génome humain. Ces récepteurs sont capables de détecter la présence d'une diversité étonnante de molécules en dehors de la cellule et d'initier une variété de cascades de signalisation intracellulaire en réponse. Les ligands vont des photons et des petits ions, aux petites molécules chimiques, et même aux protéines entières (Venkatakrishnan *et al.* 2013). Ces récepteurs sont caractérisés par la

présence de sept domaines transmembranaires hydrophobes et un mécanisme d'activation commun qui implique une protéine G hétérotrimèrique (Kniazeff *et al.* 2011).

La famille des RCPG est divisée en quatre groupes principaux A, B, C et F ou Frizzled (Lagerstrom and Schioth 2008). Les RCPG impliqués dans le goût sont divisés en deux classes : la classe A avec les récepteurs à l'amer TAS2R (chapitre III.3) et la classe C avec les récepteurs du goût de type 1 (TAS1R).

III.2.1. Structure des RCPG de classe C

Chez l'Homme, les RCPG de classe C constituent une petite famille, composée de 22 récepteurs. Parmi ces récepteurs, on trouve : les trois membres des récepteurs de type 1 du goût (TAS1R), les huit récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), les deux sous-unités formant le récepteur hétérodimérique à l'acide γ-aminobutyrique (GABAB1-2), le récepteur sensible au calcium extracellulaire (CaSR), le RCPG du groupe 6 et de sous-type A répondant aux acides aminés de la série L (GPRC6A) et sept récepteurs orphelins (**Figure 9**) (Clemmensen *et al.* 2014, Dore *et al.* 2014, Jacobsen *et al.* 2017, Koehl *et al.* 2019, Lagerstrom and Schioth 2008, Lee *et al.* 2015, Pin *et al.* 2003, Wu *et al.* 2014).

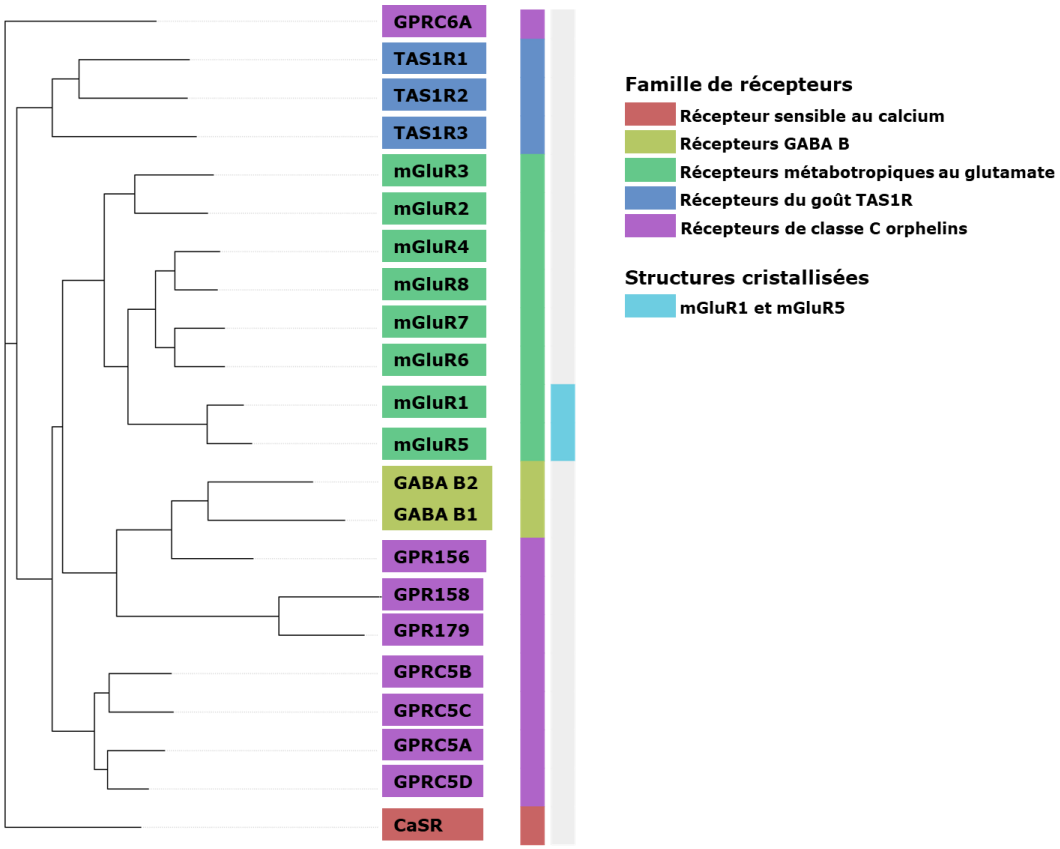

Figure 9 : Arbre phylogénétique des différents membres de la famille des GPCR de classe C.

La séquence complète d'acides aminés de chaque récepteur a été utilisée pour l'alignement. Les principaux groupes de récepteurs sont mis en évidence en couleur, ainsi que les structures cristallines résolues. L'arbre a été généré à l'aide du serveur GPCRdb.

Chez l'Homme, les trois gènes *TAS1R* sont situés sur le chromosome 1 dans une région conservée synthénique, dans l'ordre suivant : *TAS1R2* (1p36.13), *TAS1R1* (1p36.23) et *TAS1R3* (1p36.33). Chaque gène est constitué de six exons dont cinq codent pour le domaine N-terminal extracellulaire des protéines (**Figure 10**). L'existence d'épissages alternatifs au niveau des trois gènes *TAS1R1* (Bachmanov and Beauchamp 2007), *TAS1R2* (Montmayeur *et al.* 2001) et *TAS1R3* (Kiuchi *et al.* 2006) a été montrée mais leurs rôles biologiques en lien avec la détection gustative n'ont pas été établis.

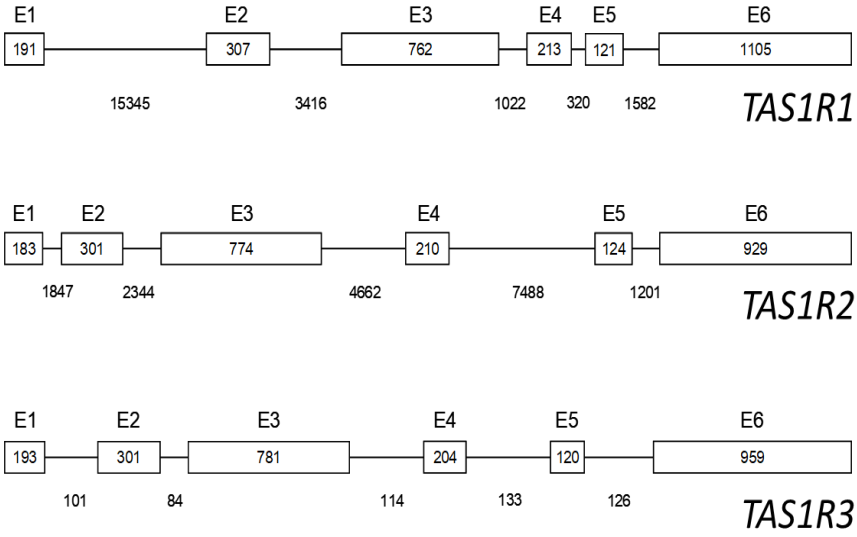

Figure 10 : Représentation schématique de la structure génomique des récepteurs TAS1R.
Les exons (E1 à E6) sont représentés par des rectangles dans lesquels leur taille est indiquée en paire de bases. Les traits reliant les exons représentent les introns sous lesquels figure la taille de chacun en paire de bases. Les exons 1 à 5 de chaque gène codent les domaines N-terminaux des TAS1R.

Les récepteurs du goût sucré et umami sont des RCPG hétéodimériques de classe C de la famille des récepteurs du goût de type 1 (TAS1R pour TASte Receptor type 1). Le récepteur du goût sucré TAS1R2/TAS1R3 est un hétérodimère formé de l'assemblage de deux sous-unités : le récepteur du goût 1 membre 2 (TAS1R2) et le récepteur du goût 1 type 3 (TAS1R3). TAS1R3 dimérise également avec le récepteur du goût 1 de type 1 (TAS1R1) pour former le récepteur de goût umami TAS1R1/TAS1R3 (Li *et al.* 2001, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003).

Les RCPG de classe C partagent certaines caractéristiques structurales. Ces récepteurs présentent un domaine extracellulaire (DEC) de grande taille, parfois appelé « dionée attrape-mouches » ou en anglais Venus Flytrap (VFT), composé de 550 à 600 résidus. Le DEC contient le domaine N-terminal (DNT) et une région riche en cystéine (RRC). Le DEC est constitué d'environ 500 acides aminés divisés en deux lobes : le lobe 1 et le lobe 2 (**Figure 11**).

Le DNT est relié au domaine transmembranaire (DTM) par la RRC d'environ 80 résidus d'acides aminés avec 9 résidus cystéine très conservés (**Figure 11**). Ces cystéines forment quatre ponts disulfures intra-domaines et un pont disulfure avec le DNT. La RRC est un domaine hautement structuré et rigide, susceptible de jouer un rôle dans la transmission de l'activation des récepteurs (Muto *et al.* 2007a, Rondard *et al.* 2006). Les récepteurs métabotropiques au glutamate mGluRs sont les principaux membres de la classe C des RCPG et ont été les plus étudiés. La structure de l'ensemble du DEC de mGluR7 a été élucidée et, avec elle, la structure de la RRC (Muto *et al.* 2007a). En effet, il a été démontré que la délétion ou la mutation de la RRC dans le CaSR ou le TAS1R3 supprime l'activation du récepteur par un agoniste (Hu *et al.* 2000, Jiang *et al.* 2004). On notera cependant que les récepteurs orphelins et les récepteurs GABAB ne possèdent pas de RRC. En effet, pour le récepteur métabotropique GABAB constitué des deux sous-unités GBR1 et GBR2, la RRC est remplacée par 15 à 17 résidus formant un peptide linker et on pense que leur mécanisme d'activation est différent des autres RCPG de classe C (Geng *et al.* 2012).

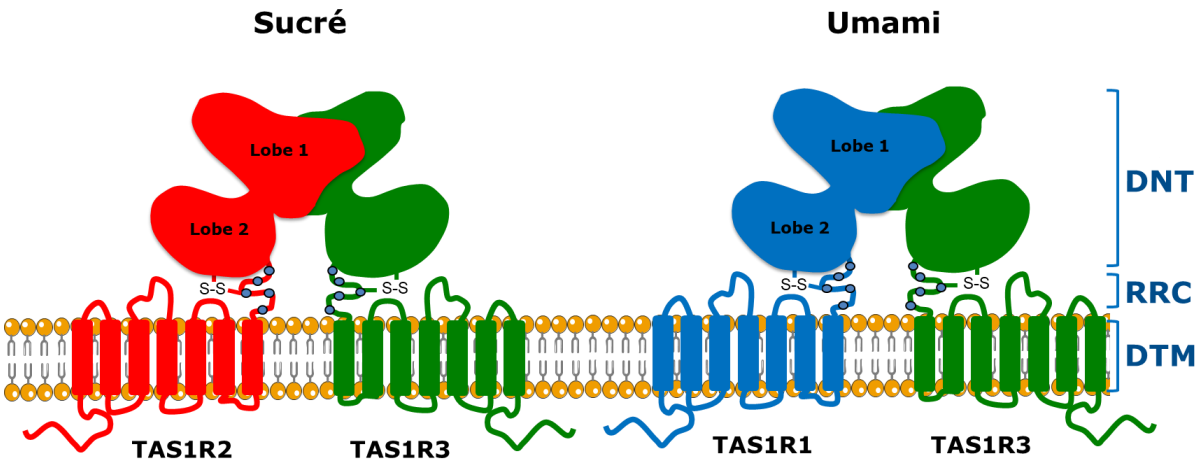

Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs du goût GPCR de classe C.

Le récepteur du goût sucré TAS1R2/TAS1R3 est un hétérodimère constitué des sous-unités TAS1R2 et TAS1R3, alors que le récepteur du goût umami est constitué des sous-unités TAS1R1 et TAS1R3. DNT : domaine N-terminal ; RRC : région riche en cystéine ; DTM : domaine transmembranaire.

Tous les récepteurs RCPG de classe C possèdent un DTM constitué de sept hélices α caractéristiques d'environ 300 à 400 résidus. La plupart d'entre eux possèdent une courte extrémité C-terminale cytoplasmique d'environ 40 résidus, à l'exception des trois récepteurs orphelins GPR156, GPR158 et GPR179, qui ont tous une extrémité C-terminale importante de 505, 550 et 1738 acides aminés, respectivement.

On notera que les DNT des RCPG de classe C présentent une forte homologie structurale avec des protéines péri-plasmiques bactériennes ayant pour rôle le transport de différents composés dont des sucres ou des acides aminés du milieu extracellulaire vers l'espace intracellulaire des bactéries (O'Hara *et al.* 1993). Les DTM des récepteurs de classe C sont apparentés phylo-génétiquement aux récepteurs à la rhodopsine (RCPG de classe A). Ainsi, il a été proposé que les récepteurs de classe C trouvent leur origine ancestrale dans la fusion entre un gène codant pour des protéines péri-plasmiques bactériennes et un autre codant un ancêtre des protéines de la famille des récepteurs à la rhodopsine (Pin *et al.* 2003).

Les structures tridimensionnelles des DNT de mGluR-I_1, mGluR-II_3 et mGluR-III_7 ont été résolues par radio-cristallographie. Elles ont révélé que les DNT de classe C sont formés de deux lobes connectés par une charnière, et forment ainsi une crevasse qui constitue le principal site de liaison, appelé site orthostérique (Kunishima *et al.* 2000 , Muto *et al.* 2007b, Tsuchiya *et al.* 2002). Chaque lobe est formé d'un feuillet β entouré d'hélices α avec des pourcentages en structures secondaires qui varient suivant les structures entre 41 et 56% en hélice α et 7 à 19% en feuillets β (Goldsmith *et al.* 1999 , Kunishima *et al.* 2000 , Nie *et al.* 2006). Plus récemment, le domaine extracellulaire (DEC) du récepteur humain au calcium hCaSR a été cristallisé (Zhang *et al.* 2016).

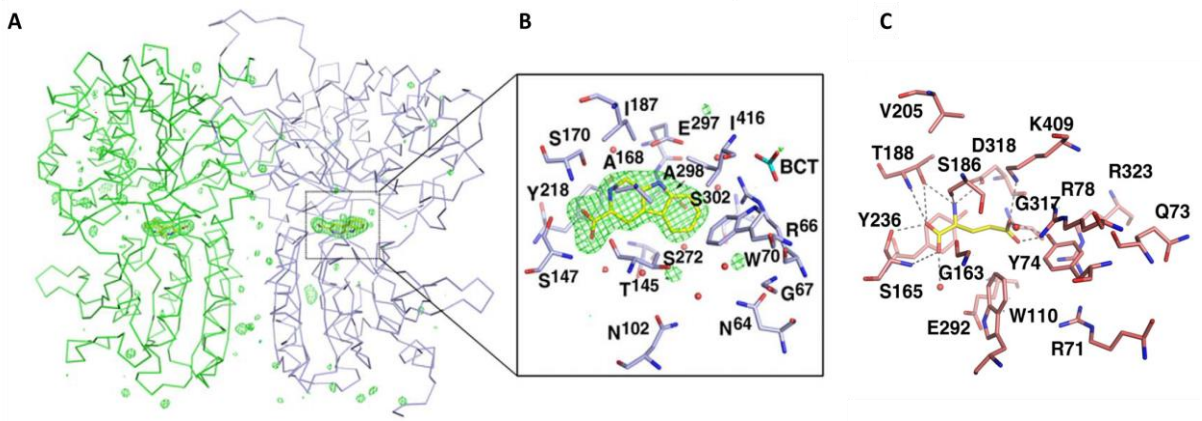

Figure 12 : Comparaison des sites de fixation des ligands pour CaSR et mGluR1.

(A) représentation des deux DNT de CaSR en présence du ligand TNCA (1,2,3,4-tetrahydronorharman-3-carboxylic acid) dérivé du L-tryptophane. Les positions impliquées dans l'interaction du TCNA sont S147, A168, S170, and Y218 (S156, S186, T188 and Y236 in mGluR1 (B)). Les résidus volumineux (Y74, W110 et R323) limitant la mobilité de la chaîne latérale Glu sont remplacés par des résidus plus petits dans hCaSR (G67, N102 et S302). En conséquence, la taille de la poche de liaison au ligand de hCaSR est significativement supérieure à celle de mGluR1, (d'après Zhang et al., 2016).

La comparaison structurelle de la poche de liaison du ligand dans la région charnière entre les lobes 1 et 2 de hCaSR-DEC avec celle de mGluR1 a révélé les bases structurales

de la sélectivité en ligand. La reconnaissance préférentielle de leurs ligands respectifs est hautement liée aux interactions avec les résidus des chaînes latérales des acides aminés constitutifs du site orthostérique. Deux résidus chargés positivement dans mGluR1 (Arg78 et Lys409) qui interagissent avec le groupe carboxylate du ligand de mGluR1 sont substitués dans hCaSR par des résidus hydrophobes Trp70 et Ile416, qui interagissent avec le noyau indole d'un dérivé du tryptophane, le TNCA (L-1,2,3,4-tetrahydronorharman-3-carboxylique acide) (**Figure 12**). Les résidus volumineux (Tyr74, Trp110 et Arg323) qui limitent la mobilité de la chaîne latérale de mGluR1 sont remplacés par des résidus plus petits dans le récepteur hCaSR (Gly67, Asn102 et Ser302). En conséquence, la taille de la poche de liaison au ligand de hCaSR est significativement plus grande que celle de mGluR1, ce qui correspond à la préférence de CaSR pour des ligands plus grands.

Il n'existe pas actuellement de structure cristalline connue pour le récepteur du goût sucré humain, mais différents modèles in silico basés sur des homologies de séquences entre GPCR de classe C cristallisé ont permis de proposer en 2017 un modèle permettant l'étude des interactions ligand-récepteur (Cheron *et al.* 2017). Cependant, récemment, la structure des DNT de l'hétérodimère TAS1r2/TAS1r3 du poisson médaka a été résolue (Nuemket *et al.* 2017). Chez cette espèce, l'hétérodimère Tas1r2a-Tas1r3 est décrit comme un récepteur des acides aminés de forme L. Cette nouvelle structure a permis de proposer un nouveau modèle *in silico* plus ajusté et validé par l'arrimage de molécules sucrées (Kashani-Amin *et al.* 2019). La structure cristalline a confirmé l'architecture bilobée du VFT domaine conformément aux résultats obtenus pour mGLuR et CaSR. L'hétérodimère montre un arrangement compact des sous-unités similaire à celui observé pour mGluR1 (Nuemket *et al.* 2017).

La structure cristalline des DNT confirme la présence d'un pont disulfure entre la Cys132 présente dans la boucle 2 de TAS1r3 et la cystéine Cys344 de la boucle 3 de TAS1r2 qui stabilise le dimère. Elle confirme aussi la fixation des L-amino-acides à l'intersection des deux lobes LB1 et LB2 qui adoptent une conformation fermée en présence des ligands avec un angle de 28° de rotation de LB2 par rapport à LB1 en position ouverte. Les groupements α-amino et carboxyle et les atomes Cα et Cβ des ligands sont positionnés de la même façon dans la poche de liaison, formant des liaisons hydrogène au niveau des résidus Gly163, Ser142 et Ser165 du LB1. Ces deux dernières positions sont d'ailleurs très conservées dans la plupart des GPCR de classe C.

A l'inverse des autres récepteurs de classe C tels que les mGluRs ou le GABAB les groupements α-substitués des ligands ne forment pas d'interactions hydrogène directes avec le récepteur mais un nombre important de molécules d'eau les entourent maintenant le ligand dans un état hydraté (Venkatakrishnan *et al.* 2019). Les liaisons hydrogène se forment donc par l'intermédiaire de ces molécules d'eau au niveau du LB2 permettant la fermeture entre les

deux lobes. Ce réarrangement particulier du réseau de liaisons hydrogène et de charges dans Tas1r2a-DNT permet sans doute à un plus grand nombre de ligands de se placer dans la poche de liaison sans faire varier la conformation de la protéine. Ainsi l'espace disponible pour la liaison des ligands est plus grand (~7Å de hauteur et ~16Å de profondeur) que celui mesuré pour le récepteur mGluR (~7Å de hauteur et ~11,5Å de profondeur). Enfin, la poche de liaison de Tas1r2 est constituée de nombreux résidus d'acides aminés aromatiques qui jouent le rôle de plateforme pour les interactions avec l'eau tout en aidant à conserver un large espace d'interaction avec le ligand à cause de leur rigidité. Ainsi la surface de la poche de liaison de Tas1r2a est une mosaïque de charges positives, négatives ou électriquement neutres, en contraste avec la poche de liaison uniformément chargée positivement observée pour le récepteur mGluR1 (**Figure 13**).

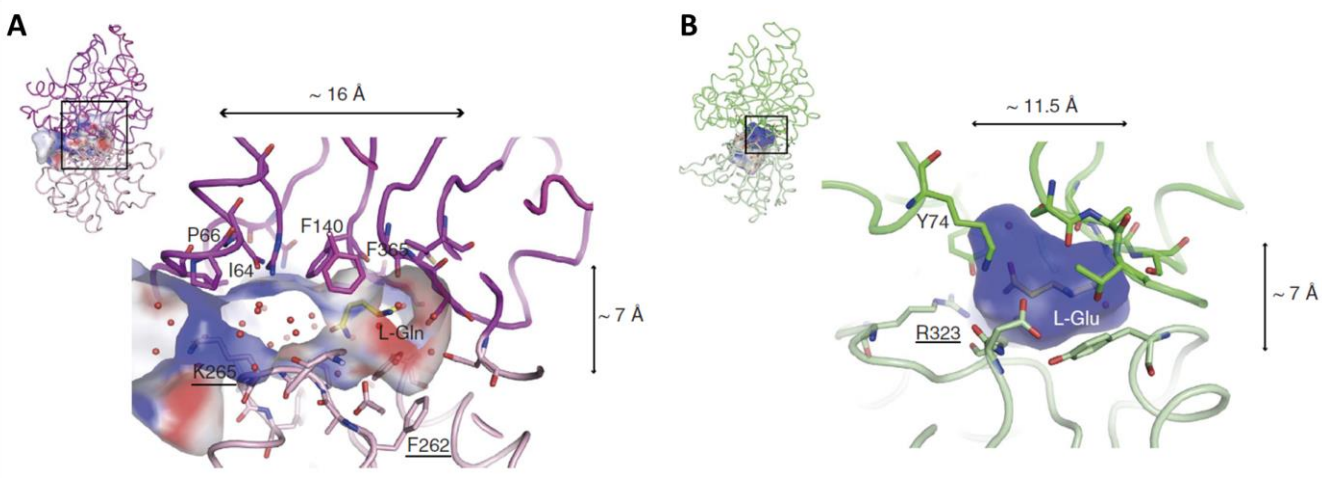

Figure 13 : Reconnaissance des acides aminés par Tas1r2a-DNT chez Medaka fish.
Poches de liaison des ligands observées sur Tas1r2a (A) et mGluR1 (PDBID 1EWK, chaîne A) (B), d'après Neumket et al. 2017.

De façon surprenante la structure cristalline a montré que le DNT de la sous-unité Tas1r3 est capable de lier les mêmes acides aminés que la sous-unité Tas1r2. De façon similaire Tas1r3-DNT adopte une conformation fermée comme Tas1r2 avec un angle de 25° entre LB2 et LB1 comparée à la conformation ouverte du récepteur mGluR1 (PDB ID 1EWK, chaîne B). Au niveau de la poche de liaison les groupements α-amino et carboxyle des ligands forment des liaisons hydrogène avec les résidus Ser150 et Thr173 du LB1. Par contre, une seule liaison hydrogène médiée par de l'eau au niveau du groupement hydroxyle de la Ser300 du LB2 semble induire la fermeture entre les deux lobes. La poche de liaison de Tas1r3 montre une hauteur de ~7,6Å de hauteur sans restriction de profondeur (**Figure 14**). Les auteurs concluent que le site de liaison de Tas1r3 n'est donc pas la sous-unité déterminante de la spécificité du récepteur (Nuemket *et al.* 2017).

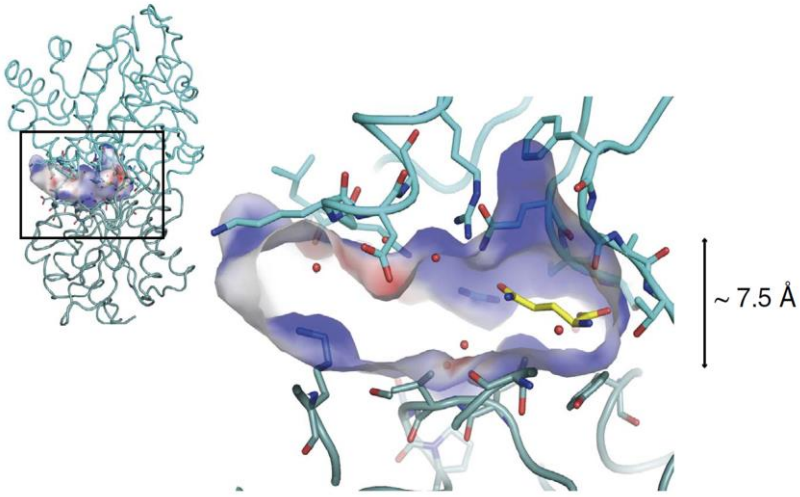

Figure 14 : Reconnaissance non-spécifiques des acides aminés par Tas1r3a-DNT chez Medaka fish.
Poches de liaison des ligands observées sur Tas1r3, d'après Neumket et al., 2017.

III.2.2. Propriétés de liaison du récepteur au goût sucré TAS1R2/TAS1R3

III.2.2.1. Rôle des domaines N-terminaux : hT1R2-DNT

Les sites de liaison orthostériques hTAS1R2-DNT et hTAS1R3-DNT ont été étudiés afin d'identifier les résidus impliqués dans la liaison des ligands. Les différences inter-espèces observées entre humains et rongeurs dans la détection de certaines molécules sucrées ont été mises à profit pour identifier des sites de liaison. Des études comportementales avaient montré que le rat ne détecte pas l'aspartame, le néotame et le cyclamate. Des récepteurs chimères exprimés dans un système cellulaire hétérologue ont permis d'identifier les résidus qui confèrent ces différences pour la liaison de ces édulcorants (Xu *et al.* 2004). Lorsque le TAS1R2-DNT humain est remplacé par le TAS1R2-DNT de rat, le récepteur ne répond pas à l'aspartame ni au néotame, mais conserve la réponse au cyclamate (Xu *et al.* 2004).

Ces études démontrent également que le site de liaison au cyclamate ne se trouve pas sur le DNT. En utilisant des tests cellulaires, combinés à la modélisation moléculaire et à la mutagenèse dirigée, le site de liaison orthostérique a été analysé de manière approfondie afin de déterminer les résidus impliqués dans la liaison du ligand. Ainsi sur le DNT de TAS1R2, les résidus Ser144 et Glu302, présents dans l'entrée de la fente de la liaison se sont avérés nécessaires pour la réponse du récepteur à l'aspartame (Xu *et al.* 2004).

Les modèles construits à partir des séquences des gènes *Tas1r2* et *Tas1r3* de neuf espèces de primates sensibles ou non à l'aspartame et quatre autres espèces insensibles à l'aspartame (vache, souris, rat et chien) ont permis d'élaborer deux nouveaux modèles

tridimensionnels des DNT de TAS1R2-TAS1R3 humains et murins (Liu *et al.* 2011). Les auteurs de cette étude ont proposé l'existence d'un deuxième site de fixation à l'aspartame, dit allostérique, présent au niveau du TAS1R2-DNT des deux espèces. Trois substitutions clés (E63N, R352E et S356R) entre les DNT de hTAS1R2 et mTAS1R2 changent la géométrie et l'orientation de ce site, augmentant ou diminuant ainsi son affinité pour l'aspartame. Ces mêmes auteurs ont montré que les résidus Ser40 et Asp142 de hTAS1R2, jouent un rôle crucial expliquant les différences inter-espèces de perception du goût sucré (**Figure 15**). De plus, chez l'homme, le résidu Ile67 de hTAS1R2, module la plus haute affinité observée pour le néotame par rapport à l'aspartame (Liu *et al.* 2011). Récemment les résidus intervenant dans la liaison à l'aspartame ont été confirmés et deux nouveaux résidus d'acides aminés ont été identifiés Ser168 et Tyr215 an niveau de hTAS1R2 (Maillet *et al.* 2015).

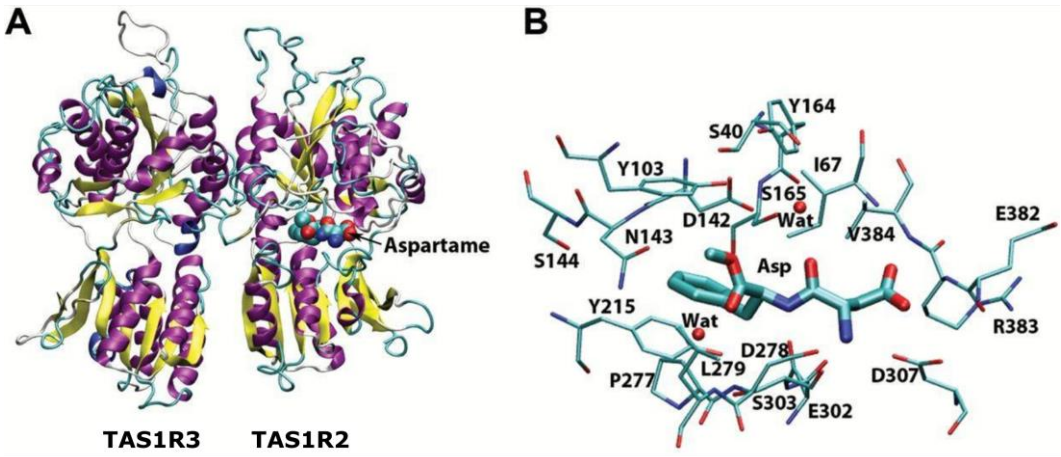

Figure 15 : Modélisation de la liaison de l'aspartame dans le site orthostérique du récepteur au goût sucré.

(A) Modélisation par homologie des DNT hTAS1R2 et hTAS1R3 du récepteur du goût sucré. (B) représentation de la structure de hTAS1R2-DNT liant l'aspartame. Seule la poche de liaison est montrée. Deux molécules d'eau (Wat) sont présentes dans la poche (figures de Maillet et al, 2015).

Par la suite, différentes mutations du récepteur hTAS1R2 ont été étudiées pour déterminer les résidus impliqués dans la liaison de l'aspartame, du D-tryptophane, du sucralose, de la saccharine, de l'acésulfame-K et du cyclamate (Masuda *et al.* 2012). Deux résidus cruciaux pour la liaison de tous les ligands mentionnés, ont été trouvés Asp142 et Asp307, ainsi que les résidus Tyr103, Pro277, Asp278 et Glu302 pour les dérivés peptidiques et le sucralose. Enfin, les résidus spécifiques de la liaison des dérivés peptidiques étaient Ser144 et Ser166, et spécifiques des sulfamates Glu382 et Arg383 (Masuda *et al.* 2012). Ces

résultats ont été confirmés sur le hTAS2R-DNT pour deux mutants (D278A et E382A) en produisant le DNT de TAS1R2 sous forme isolée, après solubilisation et repliement des corps d'inclusion obtenus en *E. coli* (Laffitte *et al.* in preparation). Les mesures de fluorescence intrinsèque des tryptophanes ont montré que le mutant D278A ne liait pas le sucralose et que le mutant E382A n'interagissait pas avec l'aspartame et l'acesulfame K.

Les DNT du récepteur au goût sucré constituent aussi la cible de modulateurs allostériques positifs appelés PAM pour *Positive Allosteric Modulator*. En général, les PAM ne montrent pas ou peu d'effets lorsqu'ils sont appliqués seuls sur le récepteur mais lorsqu'ils sont utilisés en mélange avec un agoniste, ils augmentent significativement son activité (Leach and Gregory 2017). Le même phénomène allostérique de synergie est observé entre le MSG et l'IMP sur le récepteur à l'umami. Cela a aussi été décrit précédemment pour plusieurs RCPG de classe C comme le CasR, le GABAB ou certains mGluR (Brauner-Osborne *et al.* 2007, Conn *et al.* 2009). Des travaux publiés récemment font état de la découverte de trois PAM agissant sur le récepteur humain TAS1R2/TAS1R3 exprimé en système hétérologue (Servant *et al.* 2010). Le premier, appelé SE-1, augmente l'activité du récepteur pour le saccharose, le sucralose et le néotame mais n'a pas d'effet sur d'autres composés tels que l'aspartame, l'alitame, la dulcine ou le cyclamate. Les deux autres composés (SE-2 et SE-3) ont été découverts après optimisation des fonctions chimiques de SE-1 et synergisent sur les mêmes molécules. Des tests réalisés chez l'Homme révèlent que l'ajout de 100 µM de la molécule SE-2, à une solution de 100 ppm de sucralose (251 µM), permet de réduire la concentration en sucralose de plus de 80% tout en gardant la même intensité sucrée (Servant *et al.* 2010). Le composé SE-3 (100 µM) augmente l'intensité sucrée d'une solution à 6% de saccharose (175 mM) d'un facteur 1,3 à 1,5. Il est important de souligner que lorsqu'ils sont testés seuls, les composés SE-2 et SE-3 ne sont pas perçus comme sucrés. Les PAM en question sont spécifiques au récepteur du goût sucré. SE-2 et SE-3 n'ont pas de modulation allostérique positive pour le récepteur umami suggérant que ces PAM modulent l'activation de la sous-unité TAS1R2 (Zhang *et al.* 2010). De plus, il a été montré que SE-2 et SE-3 sont spécifiques du récepteur humain. Des récepteurs chimères rat-humain ont été utilisés pour déterminer les résidus importants pour la liaison de SE-2 et SE-3. Trois résidus, Lys65, Leu279 et Asp307, se sont avérés cruciaux pour l'interaction entre hTAS1R2-DNT et les composés SE (Zhang *et al.* 2010).

III.2.2.2. Rôle des domaines N-terminaux : hTAS1R3-DNT

L'expression fonctionnelle des DNT de TAS1R2 et TAS1R3 de souris sous forme soluble a permis l'étude de leurs propriétés de liaison (Nie *et al.* 2006, Nie *et al.* 2005). Les protéines TAS1R2-DNT et TAS1R3-DNT de souris ont été exprimées avec succès en tant que protéine de fusion avec une protéine de liaison au maltose (*MBP pour Maltose Binding Protein*). Grâce à des mesures de variation de fluorescence intrinsèque des DNT, il a été montré que les deux sous-unités sont capables de lier différents composés sucrés (saccharose, glucose et sucralose) avec des affinités en accord avec les seuils physiologiques de perception. Par cette approche, il a été mis en évidence que la mutation I60T au niveau du DNT de TAS1R3 diminue l'affinité pour les trois molécules testées. Ce résultat montre que la diminution de sensibilité à la saccharine observée chez les souches de souris présentant cette mutation est directement liée à la moins bonne fixation des composés sur le DNT (Max *et al.* 2001, Reed *et al.* 2004). De plus, cette étude est la première à indiquer une implication directe du DNT de TAS1R3 murin dans la liaison de molécules sucrées. Ces résultats ont été confirmés au laboratoire en utilisant un hTAS1R3-DNT recombinant produit en *E. coli*. Ainsi, pour le sucralose une valeur de K_d de 6,9 ± 1,8 mM a été mesurée (Maitrepierre *et al.* 2012).

III.2.2.3. Implication des domaines transmembranaires

Bien que la plupart des composés sucrés se lient aux sites de liaison orthostérique des DNT de TAS1R2 et TAS1R3, certaines molécules, comme le cyclamate comme nous avons pu le voir précédemment, peuvent se fixer dans le DTM. Ces observations sont appuyées par des expériences de mutagénèse dirigée qui permettent de générer des mutations ponctuelles d'acide nucléique conduisant à des substitutions d'acides aminés dans la protéine synthétisée. L'analyse des mutants a permis de localiser le site de liaison du cyclamate au niveau des hélices transmembranaires 3, 5 et 6. Six résidus d'acides aminés se sont révélés être cruciaux pour l'interaction entre le DTM de hTAS1R3 et le cyclamate, His641, Tyr699, Ser726, Trp775, Phe778, Leu782, Cys801 et trois autres plus spécifiques du cyclamate Gln636, His721 et Arg723 (Jiang *et al.* 2005b). Les acides aminés identifiés dans ces études correspondent à des résidus impliqués dans la reconnaissance de modulateurs allostériques pour les récepteurs CasR et mGluR (Hu *et al.* 2002, Malherbe *et al.* 2003a, Malherbe *et al.* 2003b, Pagano *et al.* 2000, Petrel *et al.* 2004). Cela suggère un rôle général de ce site de liaison dans les phénomènes de modulations allostériques pour les récepteurs de classe C.

Grâce à la construction de récepteurs chimériques, la société Senomyx a identifié une nouvelle molécule au goût sucré nommée S819 [1-((1H-pyrrol-2-yl)methyl)-3-(4-isopropoxyphenyl)thiourea]. Il a été montré en tests cellulaires que cette molécule interagit uniquement avec le domaine transmembranaire de TAS1R2 (Zhang *et al.* 2008).

De même, il a été démontré que le site de liaison du lactisole, inhibiteur du goût sucré était situé dans le DTM de hTAS1R3 (Xu *et al.* 2004). En utilisant le TAS1R3 chimère rat-humain, les résidus importants pour la liaison du lactisole ont été identifiés. Il a été montré que les poches de liaison du lactisole et du cyclamate se chevauchent dans la DTM de hTAS1R3 avec 6 résidus communs et deux résidus plus spécifiques au lactisole, Ser640 et Ala733 (Jiang *et al.* 2005a). Par ailleurs, l'équipe du Prof Meyerhof a mis en évidence que l'insensibilité au lactisole observée chez les rats est due à la substitution du résidu valine en position 738 par une alanine correspondant chez l'Homme à un résidu alanine en position 733 (Winnig *et al.* 2005). En modifiant la Val738 en alanine, ces auteurs ont observé l'apparition d'une sensibilité du récepteur de rat pour le lactisole deux fois plus faible qu'avec le récepteur humain. La substitution supplémentaire de la lysine 735 par une phénylalanine, correspondant chez l'homme à un résidu phenylalanine en position 730, entraîne la restauration complète de la sensibilité au lactisole. Ces auteurs ont donc suggéré que la présence de la valine crée un encombrement stérique qui empêche l'accès du lactisole à son site de liaison (Winnig *et al.* 2005).

Les travaux de Winnig et collaborateurs ont montré que la néohesperidine dihydrochalcone (NHDC) interagit également avec le DTM de hTAS1R3 en impliquant certains des mêmes résidus mis en évidence pour le lactisole et le cyclamate (Winnig *et al.* 2007), ainsi que des résidus spécifiques pour la liaison à NHDC tels que Ser620, Val621, Gln637, Ser640, Arg725 et Phe730. Le fait que la NHDC et le lactisole partagent un site de liaison chevauchant commun explique pourquoi le lactisole n'inhibe pas le goût du NHDC et certains autres édulcorants lors d'évaluation sensorielles réalisées chez l'homme. Lors de tests cellulaires, le lactisole inhibe la liaison de la NHDC mais de manière compétitive confortant l'observation d'un site partiellement partagé. La NHDC a une meilleure affinité pour la poche de liaison au DTM que le lactisole, ce qui provoque un blocage possible de l'inhibition par le lactisole (Winnig *et al.* 2007).

III.2.2.4. Fonction de la région riche en cystéine

Les résidus impliqués dans la liaison du récepteur TAS1R2/TAS1R3 aux protéines au goût sucré n'ont pas encore été complètement élucidés. Cependant, il a été suggéré que les grandes molécules (par rapport à la plupart des édulcorants) ne peuvent pas accéder au site de liaison orthostérique des DNT de TAS1R2 ou TAS1R3 (Masuda *et al.* 2016, Morini *et al.* 2005). Il a été montré grâce à l'utilisation de chimères homme/souris, que quelques résidus situés dans la RRC de la sous-unité hTAS1R3 (Ala537 et Phe540) jouent un rôle primordial dans l'activation du récepteur humain par la brazzéine (Jiang *et al.* 2004). Cependant, ces

auteurs n'ont pas pu déterminer si ces résidus sont directement impliqués dans l'interaction avec la brazzéine ou s'ils interviennent dans la transmission du changement allostérique des DTM. De plus, en utilisant la RMN par différence de transfert de saturation (STD), Assadi-Porter et collaborateurs ont montré que la brazzéine n'est plus capable de se lier correctement lorsque le récepteur porte une mutation ponctuelle (D535Q) au niveau de la sous-unité hTAS1R3 (Assadi-Porter *et al.* 2010). Ces résultats confirment que la RRC de hTAS1R3 est directement impliquée dans la liaison de la brazzéine. Une étude récente en modélisation utilisant deux mutants de la brazzéine, l'un plus sucré que la forme sauvage et l'autre moins sucré, propose que la région DNT de hTAS1R2 est indispensable à l'interaction entre hTAS1R2/hTAS1R3 et la brazzéine (Singarapu *et al.* 2016). Cependant, le mécanisme d'activation du récepteur par la brazzéine reste à élucider.

De même, il a été montré que la RRC de la sous-unité hTAS1R3 est également impliquée dans l'interaction avec la thaumatine (Ohta *et al.* 2011). En utilisant une approche combinée d'analyses cellulaires et la mutagenèse dirigée, il a été montré que cinq résidus spécifiques de la RRC du TAS1R3 humain sont nécessaires à l'activation du récepteur par la thaumatine : Gln504, Ala537, Arg556, Ser559 et Arg560 (Ohta *et al.* 2011). L'un de ces résidus est commun pour la réponse à la thaumatine et à la brazzéine (Ala537). Récemment, après avoir généré un variant de la thaumatine (D21N), une modélisation *in silico* a été utilisée pour proposer un modèle d'interaction entre la thaumatine et le récepteur TAS1R2 / TAS1R3 (Masuda *et al.* 2016). Les expériences de modèlisation moléculaire du complexe thaumatine /récepteur a suggéré que chacun des résidus de thaumatine chargés, précédemment identifiés comme cruciaux, est proche d'un résidu du récepteur de charge opposée. Fait intéressant, le modèle entre la thaumatine mutante D21N et le récepteur a montré une réduction de la distance entre les deux protéines et l'apparition de nouvelles interactions. Ces réarrangements subtils entraîneraient une zone d'interaction élargie et renforceraient donc vraisemblablement le goût sucré de la thaumatine (Masuda *et al.* 2016). Récemment, ces résultats ont été appuyés par la comparaison des structures cristallines de la thaumatine D21N et de la thaumatine sauvage. Les conformations montrent une flexibilité au niveau des résidus 19 et 21 qui joueraient un rôle important et pourraient servir à ajuster la complémentarité des potentiels électrostatiques lors de l'interaction de la thaumatine avec le récepteur du goût sucré (Masuda *et al.* 2018, Masuda *et al.* 2019).

III.2.3. Propriétés de liaison du récepteur au goût umami TAS1R1/TAS1R3

Les travaux réalisés sur souris invalidées génétiquement (KO) pour le gène *Tas1r1* ou pour le gène *Tas1r3* ont montré que ces animaux présentaient une perte complète de sensibilité aux composés umami (Zhao *et al.* 2003). L'implication de TAS1R3 dans la perception du goût umami a été confirmée par Damak et ses collaborateurs qui ont montré que le KO de *Tas1r3* entraîne la diminution des réponses nerveuses enregistrées au niveau de la corde du tympan, induites par le mélange MSG/IMP (Damak *et al.* 2003). Dans cette deuxième étude, les souris *Tas1r3* -KO présentent une sensibilité résiduelle mais significative au MSG. L'implication partielle d'un autre récepteur à l'umami, par exemple, le mGluR-III$_4$ n'est donc pas totalement exclue (Chaudhari *et al.* 2009, Maruyama *et al.* 2006).

Il a été montré que l'agueusie au goût umami était corrélée avec du polymorphisme des gènes codant les sous-unités TAS1R1 et TAS1R3 (Raliou *et al.* 2009a, Raliou *et al.* 2009b). Des tests cellulaires combinés à de la mutagénèse dirigée ont permis de mettre en évidence que des substitutions (A110V et R507Q) dans hTAS1R1-DNT et dans hTAS1R3-TMD (F749S et R757C) étaient à l'origine de la plus faible sensibilité du récepteur (Raliou *et al.* 2011).

De plus, l'expression fonctionnelle de l'hétérodimère TAS1R1/TAS1R3 en cellules hétérologues a confirmé que ce récepteur intervient principalement dans la détection de molécules du goût umami. En effet, l'activation du récepteur humain a été mesurée pour le L-Glu, le L-Asp et le L-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4) (Li *et al.* 2002). Par ailleurs, le phénomène de synergie avec les ribonucléotides GMP et IMP, caractéristique de la saveur umami, a également été observé via l'expression fonctionnelle du récepteur (Li *et al.* 2002). Par contre, les molécules sucrées comme la saccharine, l'aspartame, le saccharose le D-Trp et le D-Glu n'activent pas le récepteur, de même que les acides aminés de la série D à l'exception de D-Ala et L-AP4 en présence d'IMP (Nelson *et al.* 2002).

Contrairement au TAS1R1/TAS1R3 humain, le récepteur de souris est activé par tous les acides aminés de la série L (Nelson *et al.* 2002). Cependant, le récepteur humain est plus sensible que le récepteur murin au L-Glu et au L-Asp (Li *et al.* 2002). Chez la souris, la synergie entre les ribonucléotides et la plupart des acides aminés de la série L a également été observée (Kawai *et al.* 2002).

III.2.3.1. Rôle des domaines N-terminaux

Les tests cellulaires ont montré l'importance de certains résidus situés au niveau du DNT de hTAS1R1 sur l'activation par le L-Glu. Les substitutions S172A, D192A, Y220A, E301A et, dans une moindre mesure, T149A annulent l'activation par le L-Glu du récepteur

TAS1R1/TAS1R3. Par ailleurs, d'autres mutations situées aussi au niveau du DNT de hTAS1R1 (H71A, R277A, S306A et H308A) abolissent la synergie avec l'IMP sans pour autant affecter l'activation par le L-Glu (Zhang *et al.* 2008).

Ces données ont mis en évidence l'existence d'au moins deux sites de liaison différents au niveau du DNT. Un site dit orthostérique pour les molécules comme le L-Glu, situé au fond de la crevasse formée par les deux lobes. Un deuxième site, appelé modulateur ou allostérique, situé à l'avant des deux lobes sur lequel les ribonucléotides comme l'IMP ou le GMP peuvent se lier. Cette fixation pourrait permettre de stabiliser ainsi le récepteur sous sa conformation fermée (**Figure 16**).

Par ailleurs, des tests cellulaires ont montré que la mutation A372T dans hTAS1R1 entraînait une plus forte sensibilité au goût umami alors que la mutation R757C dans TAS1R3 diminuait la sensibilité au MSG et au MSG plus IMP, confirmant les données sensorielles obtenues chez l'Homme (Shigemura *et al.* 2009a, Shigemura *et al.* 2009b).

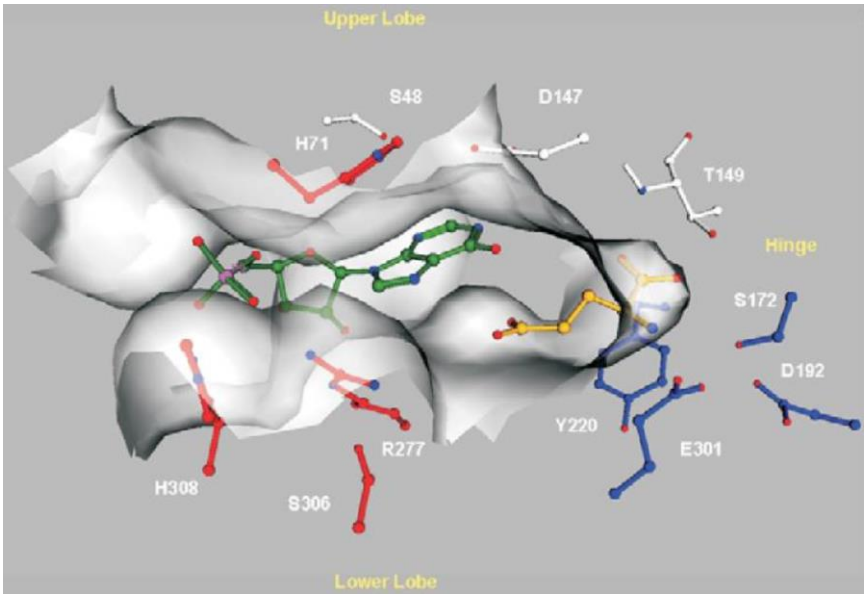

Figure 16 : Modèle d'interaction du L-glutamate et de l'IMP avec le DNT de hTAS1R1.
Les résidus d'acides aminés représentés en rouge sont impliqués dans la liaison avec l'IMP (en vert). Les résidus acides aminés représentés en bleu interagissent avec le L-glutamate indiqué en jaune (d'après Zhang et al., 2008).

Les expérimentations menées par Toda et collaborateurs ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des différences de spécificité de TAS1R1 envers différents acides aminés observés entre l'Homme et la souris (Toda *et al.* 2013). En effet, le récepteur TAS1R1/TAS1R3 humain répond spécifiquement au L-Glu, tandis que le récepteur TAS1R1/TAS1R3 de souris répond plus fortement aux autres acides aminés de la série L que le L-Glu. Dans cette étude, les auteurs ont analysé la réponse cellulaire de récepteurs

chimériques Homme-souris et de mutants ponctuels de TAS1R1/TAS1R3. Ils ont ainsi identifié 12 résidus clés situés dans le VFT de TAS1R1 qui modulent la reconnaissance des acides aminés dans les réponses du récepteur humain et de souris (**Figure 17**). La modélisation moléculaire a montré que les résidus essentiels à la reconnaissance des acides aminés acides chez l'Homme pourraient être situés au niveau du site de liaison orthostérique (Ser148, Arg151, Ala170, Glu174, Ala302 et Asp435). Les résidus Ala170 et Ala302 se sont révélés comme étant les plus critiques pour la reconnaissance des acides aminés. En revanche, les expériences de mutagénèse dirigée ont montré que tous les résidus clés responsable de la réponse large du récepteur de souris étaient situés dans des régions à l'extérieur du site de liaison orthostérique et du site de liaison allostérique de l'IMP (R307T, M320T, K328Q, K377E, K379G, and K460E). Parmi ces six mutations, la mutation K379G a entraîné les plus fortes augmentations d'activité sur les 17 acides aminés évalués. La comparaison de multiples mutants ponctuels a suggéré que la combinaison de deux mécanismes moléculaires complexes et distincts impliquant la sélectivité en acides aminés du site orthostérique et la modulation de l'activité du récepteur aux sites non orthostériques, pouvait induire la spécificité de ligand de TAS1R1/TAS1R3 (Toda *et al.* 2013).

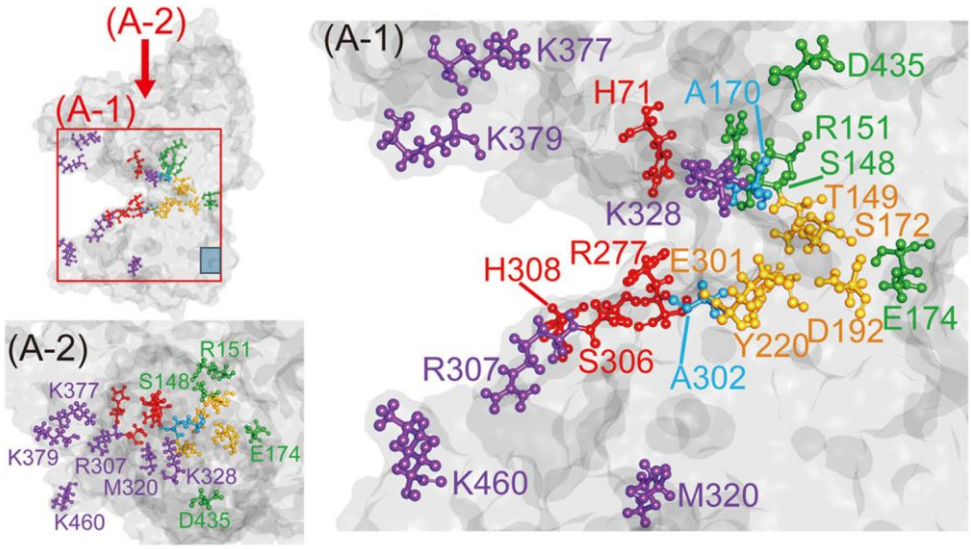

Figure 17 : Deux déterminants distincts de la sélectivité en acides aminés dans TAS1R1.
Cartographie des résidus critiques sur un modèle moléculaire du DNT de hTAS1R1. Les modèles sont orientés dans les directions horizontale (A-1) et verticale (A-2). La région charnière est à droite et l'ouverture est à gauche. Les six résidus critiques pour la reconnaissance des acides aminés identifiés dans cette étude sont de couleur verte (Ser148, Arg151, Glu174 et Asp435) et cyan (Ala170 et Ala302). Les six résidus critiques pour les réponses globalement accordées aux L-acides aminés (Arg307, Met320, Lys328, Lys377, Lys379 et Lys460) sont colorés en violet. Les résidus considérés comme critiques pour la liaison du L-Glu sont de couleur jaune (Thr149, Ser172, Asp192, Tyr220 et Glu301). Les résidus signalés comme étant critiques pour la liaison à l'IMP sont colorés en rouge (His71, Arg277, Ser306 et His308), (Figures Toda et al, 2013)

III.2.3.2. Implication des domaines transmembranaires

Un seul composé umami a été montré jusqu'à présent comme interagissant avec les domaines transmembranaires de TAS1R1. Cette molécule, nommée S807 (N-(heptan-4-yl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide), a été identifiée par la société Senomyx (Zhang *et al.* 2008).

Un phénomène de synergie comparable à celui entraîné par la liaison de ribonucléotides au DNT a été décrit au niveau du domaine transmembranaire de hTAS1R3. En effet, des tests cellulaires ont montré que le cyclamate (molécule au goût sucré dont le site de fixation se situe dans les domaines transmembranaires de hTAS1R3), n'active pas le récepteur à l'umami lorsqu'il est appliqué seul mais potentialise l'activation induite par le MSG ou l'IMP (Xu *et al.* 2004). Il convient de souligner que l'effet de la NHDC, dont le site de liaison est proche de celui du cyclamate, sur le goût umami n'a pas encore été décrit.

Comme pour le goût sucré, la saveur umami peut être inhibée par le lactisole. Des analyses sensorielles chez l'Homme ont montré que le lactisole inhibe le goût umami du MSG mais reste sans effet sur les réponses aux molécules qui synergisent comme l'IMP et le GMP (Galindo-Cuspinera and Breslin 2006). En se basant sur les données issues des précédentes études concernant l'inhibition du lactisole, Galindo-Cuspinera et Breslin ont proposé un modèle d'inhibition allostérique des récepteurs aux goûts sucré et umami par le lactisole. Selon ce modèle, la fixation du lactisole au DTM de la sous-unité TAS1R3 engendre un changement conformationnel des DNT affectant ainsi la liaison des molécules sucrées ou umami avec respectivement la sous-unité TAS1R2 ou TAS1R1. Par contre, la fixation de MSG et d'IMP sur deux sites indépendants entraîne un changement de conformation de la sous-unité TAS1R3, bloquant le site de liaison du lactisole.

Récemment, des progrès considérables ont été réalisés dans la découverte de nouveaux modulateurs des GPCR qui ne se lient pas au site orthostérique de liaison du ligand, mais se lient au site allostérique. Paradoxalement aucun de ces modulateurs allostériques n'a été identifié pour TAS1R1/TAS1R3. L'une des raisons de cette pénurie de ligands est en partie liée à la difficulté d'établir un système de mesure fiable pour hTAS1R1/hTAS1R3. Afin d'élargir la gamme de molécules d'arômes utilisables présentant des caractéristiques gustatives d'umami, des études antérieures ont principalement porté sur les constituants d'arômes salés tels que les phtalides, composés volatiles présents dans le céleri (Kurobayashi *et al.* 2008) et en particulier les composés de type acides aminés ou nucléotidiques provenant de produits alimentaires riches en goût d'umami (Behrens *et al.* 2011, Kuroda *et al.* 2012, Starkenmann *et al.* 2011). Des études ont conduit à la découverte de plusieurs nouveaux modulateurs artificiels du goût umami, par exemple, le N- (heptan-4-yl) benzo [d] [1.3] dioxole-5-carboxamide, 2E,6Z-acide nonadiénoïque, N-éthylamide, 2E,N-cyclopropylamide d'acide 6Z-nonopropylène, N-

néomenthylamide d'acide cyclopropanoïque ou certains amides d'acide N-benzyl-N- (2-pyridyléthyl) oxalique substitués (Backes *et al.* 2014, Winkel *et al.* 2008).

Quelques modulateurs d'origine naturelle présents dans certains aliments sont disponibles comme par exemple les produits alimentaires riches en acides aminés, ribonucléotides, peptides, leurs dérivés ou leurs produits de réaction générés au cours de la transformation des aliments (Behrens *et al.* 2011, Suess *et al.* 2014, Winkel *et al.* 2008). On notera l'existence de quelques études sur les métabolites secondaires de plantes présentant ou modulant le goût umami. Par exemple, le morelide dérivé de l'acide malique a été trouvé dans des champignons de type morilles et module faiblement le goût umami évoqué par le MSG (Rotzoll *et al.* 2006). Le polyphénol théogalline a été identifié comme étant l'un des composants du caractère umami du thé vert (Kaneko *et al.* 2006). La rubemamine a été trouvée dans le chénopode blanc, variété proche des épinards et la rubescénamine dans l'écorce de *Zanthoxylum rubescens* consommé en Afrique sous forme de bâton à mâcher. Ces deux dérivés de N-cinnamoyle phénéthylamine substitués sont capables d'activer le récepteur TAS1R1/TAS1R3 en expression fonctionnelle (Backes *et al.* 2015).

Plus récemment, le méthional, composé aromatique présent dans les tomates, le fromage ou la sauce soja, a été décrit comme un modulateur du goût umami (Toda *et al.* 2018). Plus précisément, la mutagenèse dirigée et la modélisation moléculaire ont montré que le méthional et le 3-(methylthio)butanal pouvaient potentiellement se lier à deux sites distincts du domaine transmembranaire de TAS1R1 et que les résidus d'acides aminés situés au fond de la poche allostérique engendraient un effet différent entre les récepteurs humains et murins. Ainsi chez l'Homme ce composé a un effet de PAM alors qu'il a un effet de NAM (*Negative Allosteric Modulator*) chez la souris (Toda *et al.* 2018). C'est la première fois qu'un composé est décrit comme pouvant interagir avec TAS1R1-DTM.

III.3. Les récepteurs à l'amertume TAS2R

III.3.1. Structure des TAS2R

La classification des récepteurs à l'amer TAS2R n'a pas toujours été claire. Certains systèmes de classification les décrivent comme une famille potentiellement à part (Horn *et al.* 2003), alors que d'autres les ont regroupés avec les récepteurs de classe F encore appelés récepteurs Frizzled (Fredriksson *et al.* 2003). L'accumulation des données tend désormais à classer les récepteurs à l'amer dans la classe A dit rhodopsin-like GPCRs (Adler *et al.* 2000, Chandrashekar *et al.* 2000, Di Pizio *et al.* 2016, Matsunami *et al.* 2000) comme les récepteurs olfactifs. Les récepteurs TAS2R constituent la plus grande famille de récepteurs gustatifs.

Les espèces animales présentent un nombre de récepteur à l'amer variable qui peut aller de 3 récepteurs chez le poulet à 49 chez la grenouille, avec 33 récepteurs pour la souris,

36 pour le rat ou encore 15 chez le chien (Dong *et al.* 2009). Le génome humain code 25 TAS2R localisés sous forme de cluster principalement sur les chromosomes 7 et 12 mais aussi sur le chromosome 5 (Conte *et al.* 2002, Lagerstrom and Schioth 2008, Shi and Zhang 2006). Les gènes *Tas2r* contiennent en moyenne 900 paires de base et aucun intron (**Figure 18**).

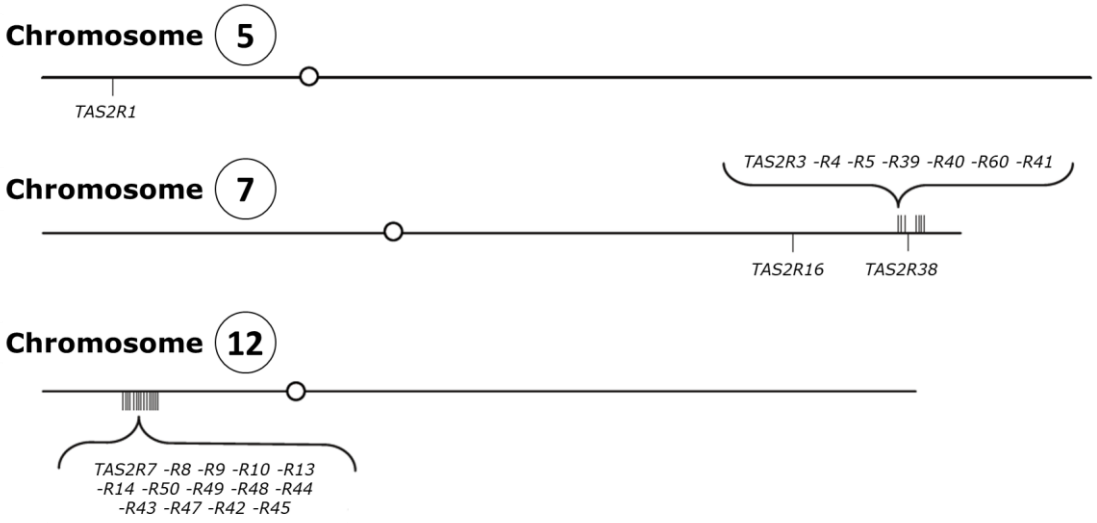

Figure 18 : Emplacements et orientations chromosomiques des gènes TAS2R humains.
Les emplacements des gènes TAS2R sont approximativement dessinés à l'échelle. Les cercles représentent les centromères des chromosomes. Les nombres identifient les chromosomes. Les gènes TAS2R sont affichés dans l'ordre dans les loci (d'après Meyerhof, 2005).

Les TAS2R sont constitués de 290 à 333 résidus d'acides aminés. Comme tous les RCPG de classe A, les protéines présentent une organisation structurale commune avec sept hélices transmembranaires (7TM) (TM1 à TM7) connectées par trois boucles extracellulaires (ECL1-3) et trois boucles intracellulaires (ICL1-3). Le domaine 7TM peut être divisé en deux modules comprenant le module extracellulaires (EC) et le module intracellulaire (IC). Le domaine 7TM constitue le noyau structural qui subit des changements de conformation lors de la liaison du ligand et transmet les signaux de la région extracellulaire à la région intracellulaire, permettant ainsi l'activation de la protéine G. L'extrémité N-terminale, située du côté extracellulaire, et les ECL interviennent dans la reconnaissance d'une grande variété de ligands, ils présentent donc une grande diversité structurale entre les différents TAS2R. Les récepteurs TAS2R présentent une extrémité N-terminale courte et souvent non structurée. Les ECL des GPCR de classe A contiennent souvent des ponts disulfures essentiels au maintien de la stabilité d'une boucle, notamment l'ECL2 qui est reliée ainsi à la pointe du TM3. Étonnamment, ce pont disulfure n'est pas conservé pour les TAS2R. L'extrémité C-terminale et les ICL interagissent avec les protéines G, les arrestines, les RCPG kinases (GRK) et

d'autres effecteurs de signalisation en aval, qui sont essentiels pour la transduction du signal et d'autres fonctions modulatrices du récepteur. De ce fait, la région IC est relativement conservée. L'extrémité C-terminale contient généralement une hélice α, appelée couramment hélice 8, qui est positionnée parallèlement à la membrane. Cette hélice se caractérise généralement pour les GPCR de classe A par la présence d'un motif amphiphile commun [F (RK) xx- (FL) xxx] (Di Pizio *et al.* 2016, Lee *et al.* 2018) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Motifs conservés dans les GPCR de classe A et leur contrepartie dans les TAS2R.

	Class A GPCRs	TAS2Rs
TM1	$N^{1.50}xxV^{1.53}$	$N^{1.50}xxI^{1.53}$
TM2	$L^{2.46}xxxD^{2.50}$	$L^{2.46}xxxR^{2.50}$
TM3	$D[E]^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}$	$F^{3.49}Y^{3.50}xxK^{3.53}$
TM4	$W^{4.50}$	Position 4.50 is not conserved
TM5	$P^{5.50}$	$P^{5.50}$
TM6	$F^{6.44}xxxW^{6.48}xP^{6.50}$	$F^{6.44}xxxY^{6.48}$ Position 6.50 is not conserved
TM7	$N^{7.49}P^{7.50}xxY^{7.53}$	$H^{7.49}S^{7.50}xxL^{7.53}$

Des expériences *in vitro* faisant appel aux techniques de co-immunoprécipitation et de transfert d'énergie de résonance en bioluminescence (BRET Bioluminescence Resonance Energy Transfer) ont révélées que les TAS2R forment des oligomères, à la fois homomères et hétéromères. Cependant, l'hétéro-oligomérisation n'a montré aucune influence évidente sur la localisation membranaire des récepteurs ou les propriétés de liaison des agonistes (Kuhn *et al.* 2010).

Les 25 récepteurs TAS2R présentent entre eux une faible conservation de séquence dans les domaines TM allant de 16% à 84%, cette similarité est évaluée à 13-29% avec les récepteurs de classe A et 15-27% avec ceux de classes F (Di Pizio *et al.* 2016). La comparaison avec les TAS2R révèle que des motifs importants de classe A (tels que le motif D [E] RY dans TM3, CWxP dans TM6 et le motif NPxxY dans TM7) sont absents dans les TAS2R (Di Pizio *et al.* 2016, Jaggupilli *et al.* 2017). En outre, le pont disulfure hautement conservé (entre les résidus Cys25 de l'ECL3 et le résidu Cys191 dans ECL2, dans β2ADR, (PDB ID: 3SN6) (Rasmussen *et al.* 2011), qui facilite la stabilisation de la structure des GPCR de classe A (Lagerstrom and Schioth 2008), n'est pas présent dans les TAS2R.

Bien qu'aucun récepteur à l'amer n'ait encore été cristallisé, de nombreux travaux utilisent les structures déjà cristallisées d'autres RCPG de classe A pour modéliser les interactions récepteur-ligand (Fierro *et al.* 2017, Suku *et al.* 2017) (**Figure 19**).

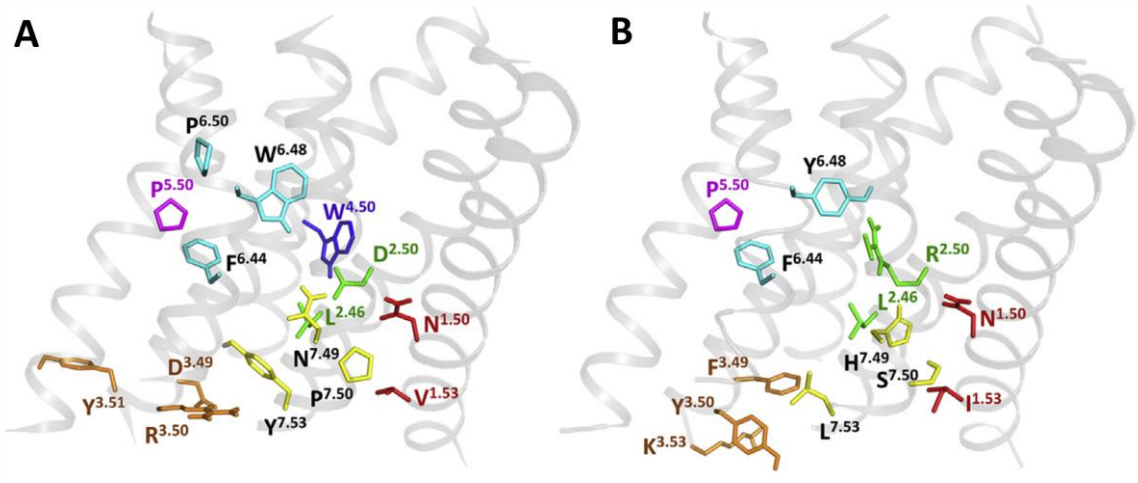

Figure 19 : Cartographie des résidus conservés sur les GPCR de classe A.
Comparaison des résidus conservés au niveau de la poche de liaison entre (A) la structure moléculaire du récepteur β2-adrénergique (β2ADR) (PDB 3SN6) et (B) le modèle moléculaire du récepteur à l'amer TAS2R14. Les résidus conservés sont colorés en rouge (TM1), vert (TM2), orange (TM3), bleu (TM4), magenta (TM5), cyan (TM6), et jaune (TM7) (d'après Di Pizio, 2016).

Des études de modélisations moléculaires conduites avec TAS2R1 ont prédit l'interaction de TM3-TM5-TM6-TM7 en combinaison avec ECL2 pour former la poche de liaison othostérique. Ces études ont montré que trois résidus d'acides aminés His112, Pro113, Leu114 dans ICL2 forment une hélice impliquée dans les interactions hydrophobes avec la protéine G (Dai *et al.* 2011). En ce qui concerne TAS2R38, il a été prédit que les TM3 et TM6 ou TM5 et TM6 jouent un rôle dans l'activation du récepteur (Tan *et al.* 2012). TAS2R38 possède des variants polymorphiques naturels qui conduisent aux substitutions P49A dans la boucle ICL1, A262V dans le TM6 et V296I dans le TM7,et qui jouent un rôle crucial dans la fonction du récepteur. En effet, la présence de P49A dans ICL1 contribue au phénotype « non sensible » à certains composés amers comme le 6-n-propylthiouracil (PROP) et le phénylthiocarbamide (PTC). Étant donné que pour ce phénotype le récepteur TAS2R38 ne parvient pas à se lier à la protéine G, il semble que la boucle ICL1 soit impliquée dans le couplage du récepteur avec la protéine G (Pydi *et al.* 2012).

L'extrémité C-terminale cytoplasmique des RCPG joue un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire, le trafic et l'internalisation des récepteurs (Pankevych *et al.* 2003,

Upadhyaya *et al.* 2015). L'extrémité C-terminale de TAS2R4, qui comprend 17 acides aminés, est polybasique avec six lysines et une histidine et pourrait avoir un rôle non seulement sur la fonctionnalité du récepteur mais également dans sa bonne insertion dans la membrane (Upadhyaya *et al.* 2015). L'alignement des séquences des TAS2R a conduit à l'identification d'un motif KL (K / R), qui est conservé dans 18 des 25 TAS2R humains et chez 9 autres TAS2R d'autres espèces analysées. Des mutations dans la plupart de ces résidus ont réduit l'expression du récepteur à la surface cellulaire et la fonctionnalité du récepteur TAS2R4, indiquant l'importance de certains de ces motifs dans le trafic et la signalisation des récepteurs. La mutation de la lysine distale (Lys296) dans le motif KL (K / R) entraîne une activité constitutive basale 5 fois supérieure dans les cellules à celle du TAS2R4 de type sauvage suggérant que la Lys296 joue un rôle important dans la stabilisation de la conformation active du récepteur (Upadhyaya *et al.* 2015).

III.3.2. Propriétés de liaison des récepteurs au goût amer TAS2R

Les récepteurs humains à l'amer sont capables de détecter un nombre considérable de substances amères présentant une grande diversité chimique (Meyerhof *et al.* 2010). Cette capacité est liée à la grande variabilité de leur séquence qui leur confère des propriétés structurales et d'interactions très variées. Fait intéressant, les profils d'agonistes qui se chevauchent pour des récepteurs, ne correspondent pas nécessairement à des similitudes de séquence d'acides aminés des récepteurs. Inversement, les TAS2R de séquences différentes peuvent présenter des similitudes remarquables dans leurs profils de réponse (Behrens and Meyerhof 2009, Born *et al.* 2013).

On classe les TAS2R humains en quatre catégories (**Figure 20**). Les trois récepteurs, TAS2R10, TAS2R14 et TAS2R46, capables d'interagir avec un large spectre d'agonistes, répondant chacun à plus d'un tiers des substances évaluées forment le groupe des TAS2R généralistes. Leurs activités combinées suffisent à détecter environ la moitié des substances amères testées jusqu'à présent. Les récepteurs dits « spécialistes », TAS2R3, TAS2R5, TAS2R13, TAS2R20, TAS2R41, TAS2R50, détectent peu de composés amers. Les récepteurs « intermédiaires », TAS2R1, TAS2R4, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R30, TAS2R31, TAS2R39, TAS2R40, TAS2R43, sont les plus nombreux. Enfin, deux récepteurs « sélectifs/spécifiques », TAS2R16 et TAS2R38 qui présentent une sélectivité prononcée pour une classe chimique de composés amers, les β-D-glucopyranosides (Bufe *et al.* 2002) et les composés qui contiennent la fonction thiourée comme le phénylthiocarbamide (PTC) ou le propylthiouracyl (PROP) (Bufe *et al.* 2005). A ce jour, quatre récepteurs humains restent encore orphelins, TAS2R19, TAS2R42, TAS2R45 et TAS2R60 soit parce qu'ils sont très

sélectifs et que leur ligand n'a pas été identifié, soit que les variants exprimés en système hétérologue ne sont pas les formes actives du récepteur ou encore que ces récepteurs ne sont pas fonctionnels dans le test cellulaire mis en œuvre (Behrens and Meyerhof 2018).

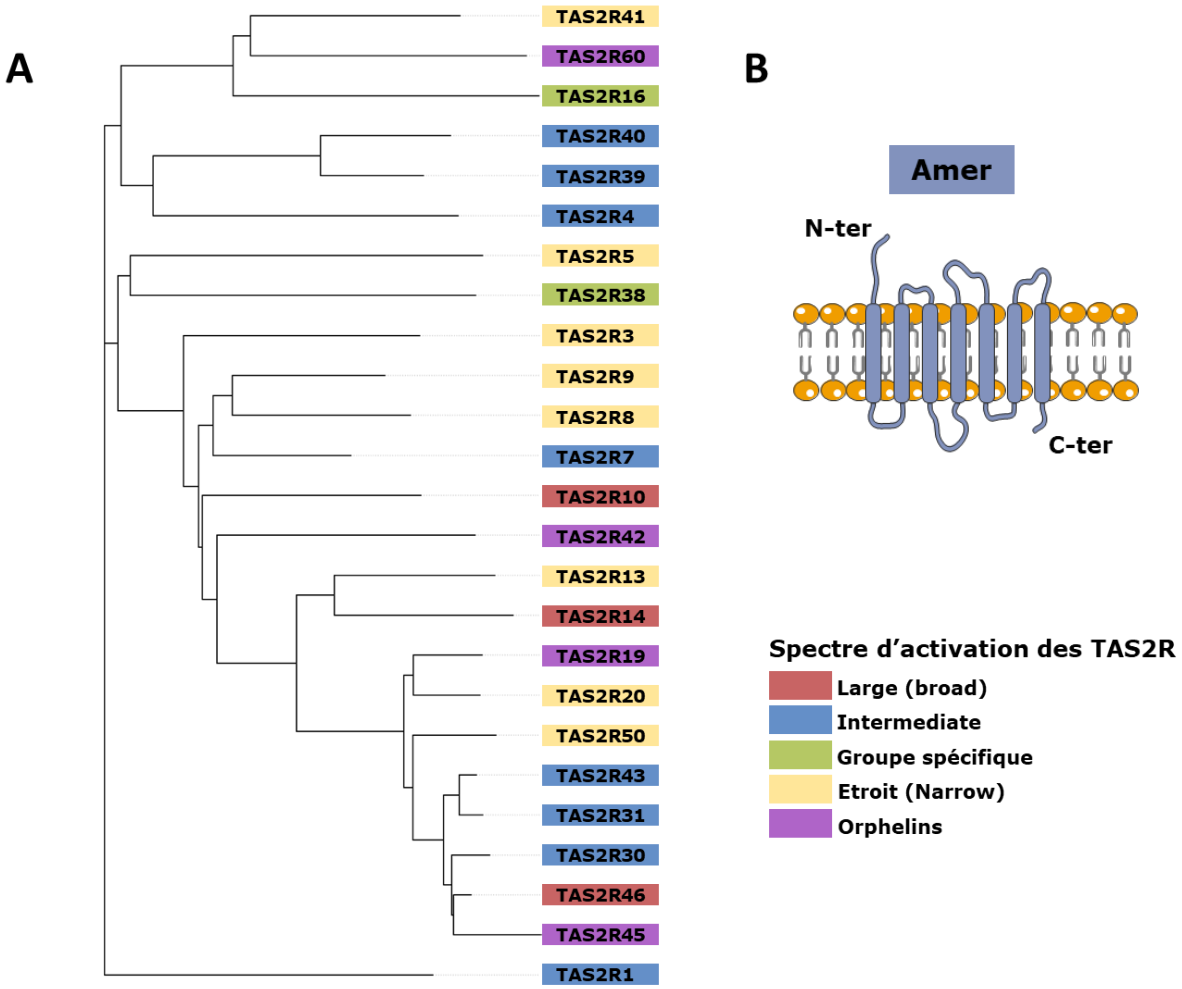

Figure 20 : Arbre phylogénétique des différents membres de la famille des TAS2R.

(A) Représentation schématique des récepteurs du goût amer. (B) La séquence complète d'acides aminés de chaque récepteur a été utilisée pour l'alignement. Les récepteurs sont colorés en fonction de leur capacité à activer une ou plusieurs molécules (d'après Meyerhof, 2010). L'arbre a été généré à l'aide du serveur GPCRdb.

Récemment, l'analyse du répertoire des 34 récepteurs de souris sur 128 molécules amères a permis de déorphaniser 19 d'entre eux et de confirmer l'existence de catégories en fonction de leurs capacités de réponse. Comparés à l'Homme, ces premiers résultats montrent que les souris possèdent moins de récepteurs à large spectre mais un nombre élevé de récepteurs spécialistes (Lossow *et al.* 2016). Cette étude montre aussi que les récepteurs orthologues ont des profils d'agonistes différents suggérant que les développements géniques

spécifiques à certaines espèces ont permis une plus ou moins grande diversification des spectres de reconnaissance des substances.

Après la déorphanisation réussie de la majorité des TAS2R humains, des études détaillées sur le mécanisme de l'interaction des agonistes avec les TAS2R ont commencé à montrer comment ces récepteurs extrêmement polyvalents accueillent autant de composés amers différents dans leurs poches de liaison sans sacrifier leur spécificité. En l'absence de structure cristalline, de nombreuses études ont mis en œuvre des stratégies de modélisation par homologie et d'arrimage de molécules amères.

La première étude sur les relations structure-fonction a été réalisée sur le récepteur TAS2R46. Bien que classé parmi les récepteurs généralistes, TAS2R46 est capable de répondre spécifiquement à la famille des composés terpénoïdes (Brockhoff *et al.* 2007). Les auteurs ont combiné des expériences *in silico* de modélisation par homologie de séquence, d'arrimage moléculaire et des tests cellulaires *in vitro* combinés à la mutagenèse dirigée du récepteur. Les résultats ont permis de démontrer que les agonistes interagissent avec le récepteur dans une seule poche de liaison orthostérique avec des points de contacts chevauchants (Brockhoff *et al.* 2010). Ainsi les résidus Asn172, Asn173, Thr174 dans ECL2, Tyr258, Lys270 dans ECL3, Ala90, Phe91, Phe92 dans TM3 et Tyr155 dans TM4 forment la poche de liaison commune aux agonistes et antagonistes du TAS2R4 (Pydi *et al.* 2015, Pydi *et al.* 2014).

Une étude ultérieure sur TAS2R46 a mis en évidence que les agonistes avant d'entrer dans la poche de liaison orthostérique occupent de manière transitoire un site de liaison vestibulaire, ce qui pourrait servir de « filtre de spécificité » pour les agonistes (Sandal *et al.* 2015). Récemment, le rôle fonctionnel d'un site vestibulaire, présent au niveau des extrémités extra-cellulaire de TM5 et TM6, a récemment été démontré pour les récepteurs olfactifs de classe I (Bushdid *et al.* 2019). Pour le récepteur TAS2R46, ce site proche de la région extracellulaire contiendrait plus de 12 molécules d'eau qui solvatent l'agoniste de TAS2R46, la strychnine, et permettent des interactions avec divers résidus acides aminés (**Figure 21**). Ces interactions forment un canal d'accès au site orthostérique situé à un endroit plus profond de la poche de liaison avec une solvatation plus faible. Les résidus dans les boucles ECL de TAS2R46 tels que Leu71, et Glu70 dans ECL1, Asn148, Asn150 et Trp154 dans ECL2 et Glu253 dans ECL3, sont importants pour la reconnaissance moléculaire et l'activation des récepteurs. Les acides aminés Trp66 dans TM2, Trp88 dans TM3, Glu265 dans TM6 et Phe269 dans TM7 forment le site de liaison orthostérique de la strychnine. Les positions Trp88 et Glu265 dans TAS2R46 sont conservées dans la plupart des TAS2R. Cela suggère la possibilité que les récepteurs TAS2R possèdent deux sites de liaison (Sandal *et al.* 2015). Les modélisations et les résultats des expérimentations sur cellules ont mis en évidence les résidus

importants pour l'interaction de la strychnine et de TAS2R46 au niveau vestibulaire uniquement (L71 dans ECL1, Ile82 dans TM3, Asn176 dans TM5) et ceux importants au niveau des interactions vestibulaires et orthostériques (Tyr241 et Ile245 dans TM6 et Glu265 dans TM7).

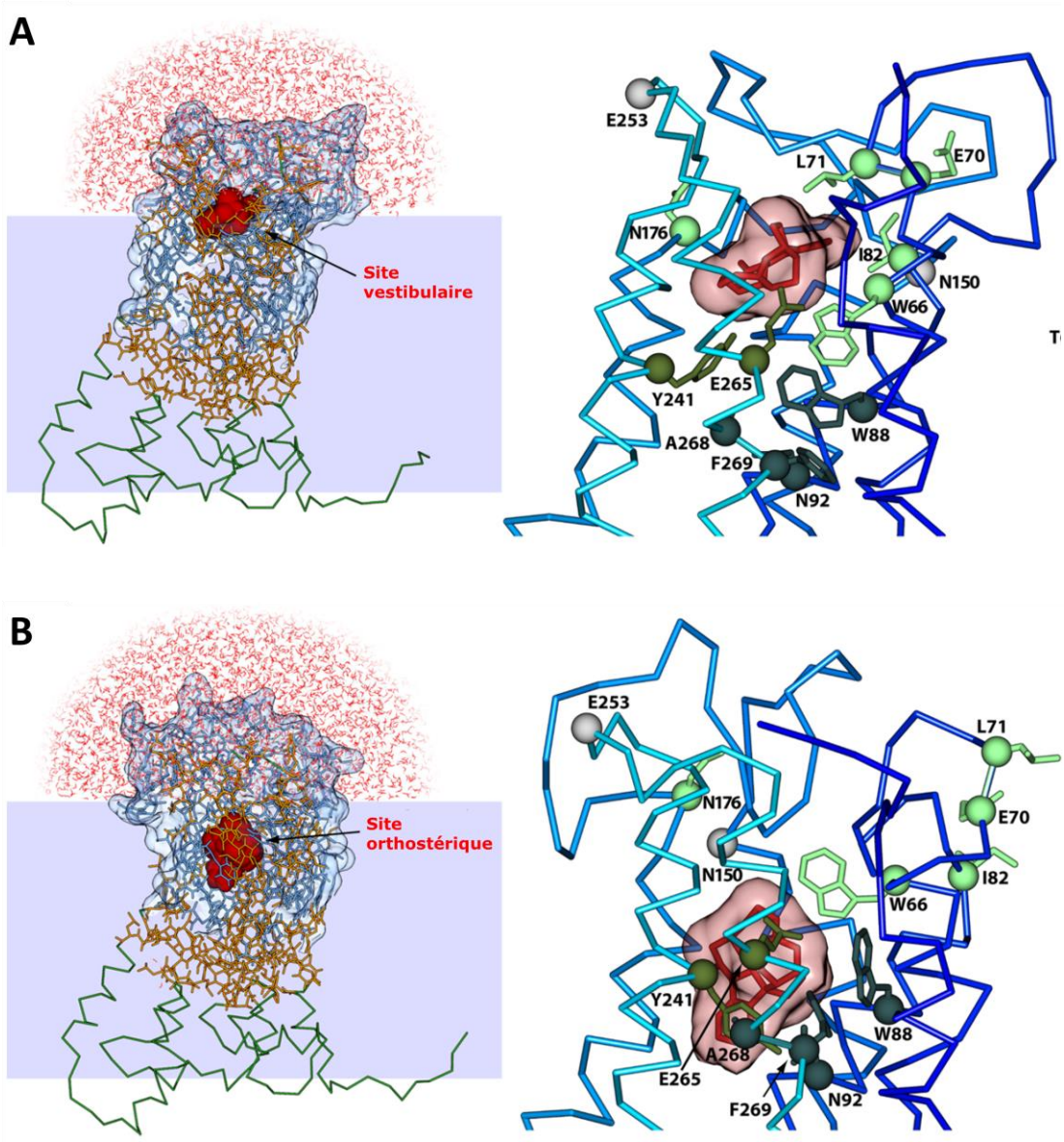

Figure 21 : Modélisation moléculaire dynamique de TAS2R46 en présence de strychnine.
(A) représentation du site vestibulaire, (B) représentation du site orthostérique. La strychnine est représentée en rouge foncée. Le squelette protéique est représenté en bleu foncé du côté N-terminal et en bleu clair du côté C-terminal. Les résidus impliqués dans le site vestibulaire son colorés en vert clair. Les résidus en gris ont été montrés comme importants pour la liaison orthostérique au niveau des boucles ECL2 et ECL3. Les résidus en vert foncé sont impliqués dans la liaison orthostérique (d'après Sandal et al., 2015).

Une étude de mutagénèse dirigée portant sur le TAS2R10 humain a permis d'identifier les résidus impliqués dans l'activation de ce récepteur et d'étudier l'effet de différentes substitutions sur son profil de réponse à diverses molécules amères (Born *et al.* 2013). De façon surprenante, les mutations S85A et Q175A ont montré un impact différentiel sur la stimulation par différents agonistes, soutenant l'interaction avec certains agonistes, tout en perturbant l'interaction avec d'autres agonistes. Cela suggère que ce récepteur est « optimisé » pour interagir avec de nombreux agonistes au détriment d'affinités potentiellement plus élevées pour les agonistes individuels. Par ailleurs, les auteurs ont constaté que TAS2R10 et TAS2R46 lient la strychnine par des mécanismes d'interactions différents. Ceci indique que la capacité de différents TAS2R à répondre aux mêmes substances amères ne résulte pas nécessairement de caractéristiques pharmacologiques conservées ou « héritées » à partir de récepteurs amers ancestraux communs, mais qui ont plutôt évolué indépendamment au cours du temps (Born *et al.* 2013).

D'autres études de relation structure-fonction ont confirmé la présence de la poche de liaison enfouie dans le premier tiers supérieur du domaine transmembranaire et mis en évidence certains des domaines transmembranaires impliqués, ainsi que les résidus importants dans les interactions. C'est le cas notamment pour le récepteur TAS2R16 dont le site de liaison orthostérique est formé par TM3, TM5 et TM6, au niveau desquels Glu86 (TM3), Trp94 (TM3) et His181 (TM5) interagissent directement avec la salicine, alors que les résidus Phe93 (TM3), Phe240 (TM6) et Ile243 (TM6) participent à la formation de la poche de liaison (Sakurai *et al.* 2010). Les résidus identifiés dans la liaison du PTC au récepteur TSA2R38 sont les résidus Asn103 (TM3), Trp99 (TM3), Met100 (TM3), Phe255 (TM6) et Val296 (TM7). D'autres données suggèrent que les résidus Trp99, Met100 et Ser259 (TM6) contribuent aussi à définir la taille et la forme de la cavité de liaison (Biarnes *et al.* 2010). Des expérimentations ont montré que les résidus Asn103 (TM3), Phe197 (TM5), Trp201 (TM5) et Phe264 (TM6) sont communs à l'interaction du PTC et du PROP, les deux agonistes du récepteur TAS2R38 par ailleurs très utilisés en analyse sensorielle (Marchiori *et al.* 2013). Récemment des études conduites sur TAS2R7 montrent que les résidus Asp86, Ser181 et Trp170 présents sur le côté extracellulaire de TM3, TM5 et dans la boucle ECL2 sont essentiels pour la liaison des agonistes. Des mutations de ces acides aminés entraînent une perte de fonction. Ces résultats montrent que les agonistes se lient sur un site extracellulaire plutôt que profondément dans la poche de liaison, impliquant des résidus présents dans l'hélice ECL2 et les TM du TAS2R7 (Liu *et al.* 2018) et confirment aussi l'existence et le rôle fonctionnel du site vestibulaire pour les TAS2R.

Une autre conséquence de la déorphanisation des TAS2R repose sur la possibilité d'identifier des antagonistes des TAS2R qui pourraient notamment agir comme des inhibiteurs

du goût amer. Ces molécules sont susceptibles de devenir des outils précieux pour la recherche fondamentale et la recherche appliquée, notamment pour réduire la perception du goût amer dans les formulations médicamenteuses pédiatriques. À l'avenir, les connaissances détaillées sur l'architecture des récepteurs amers, les poches de liaison des agonistes et les inhibiteurs des récepteurs amers pourraient même permettre la conception rationnelle de nouveaux modulateurs des récepteurs amers.

Le premier antagoniste des TAS2R à action assez large a été découvert par la société Givaudan lors d'un criblage à haut débit orienté sur la découverte de petites molécules capables de bloquer le mauvais goût amer des édulcorants artificiels de type sulfonylamides : la saccharine et l'acésulfame-K (Slack *et al.* 2010). Cette étude a montré que l'acide 4-(2,2,3-triméthyl-cyclopentyl)-butanoïque, également connu sous le nom de GIV3727, inhibe puissamment l'activation des deux récepteurs amers répondant à la saccharine et à l'acésulfame-K, TAS2R31 et TAS2R43, en agissant de façon compétitive (Slack *et al.* 2010).

Récemment le mécanisme de réduction de l'amertume de la saccharine par le cyclamate a été élucidé grâce aux récepteurs TAS2R. Les industriels ont fréquemment recours à des mélanges combinant des édulcorants non caloriques dans une formulation unique. Le mélange le plus ancien, qui permet des niveaux de sucrosité plus élevés, combine la saccharine avec du cyclamate. Ce mélange offre l'avantage aussi de réduire l'amertume de chaque molécule isolée. Les études fonctionnelles en cellules ont démontré que le cyclamate est capable d'inhiber les deux récepteurs TAS2R31 et TAS2R43 responsables du goût amer de la saccharine et inversement, la saccharine supprime les réponses du récepteur amer TAS2R1 au cyclamate (Behrens *et al.* 2017). Par conséquent, la suppression mutuelle des réponses TAS2R explique la plus faible amertume des mélanges de ces édulcorants non caloriques.

Le mécanisme d'action des inhibiteurs compétitifs naturels de l'amertume, le 3β-hydroxydihydrocostunolide (3HDC) et le 3β-hydroxypélénolide (3HP), ont aussi été mis en évidence pour le récepteur TAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2011). Du point de vue de leur structure chimique, ces composés sont remarquablement similaires aux agonistes connus du récepteur TAS2R46 mais agissent en tant qu'agonistes compétitifs. Étant donné que ces deux substances, 3HDC et 3HP, sont présentes dans les mêmes plantes produisant des lactones sesquiterpéniques activant TAS2R46, un niveau de complexité inattendu pour l'amertume des plantes est devenu évident. Depuis, un nombre croissant de bloquants d'amertume ont été identifiés indiquant que de telles molécules ne sont pas rares. Ainsi, la probénécide, médicament utilisé dans le traitement de la goutte, est capable d'inhiber la réponse du récepteur TAS2R16 à la salicine (Greene *et al.* 2011) et les récepteurs TAS2R38 et TAS2R43. Les 6-methoxyflavanones 4'-fluoro-6-methoxyflavanone, 6,3'-dimethoxyflavanone, et 6-methoxyflavanone sont capables d'inhiber la réponse du récepteur TAS2R39 à l'ECG

(epigallocatéchine gallate) et dans une moindre mesure celle du récepteur TAS2R14 (Roland *et al.* 2014).

Des expériences d'expression fonctionnelle conduites avec les récepteurs humains sensibles à la caféine (TAS2R7, TAS2R10, TAS2R14, TAS2R43 et TAS2R46) ont révélé que le (R)-citronellal bloquait complètement la réponse du récepteur TAS2R43 induite par la caféine, et dans une moindre mesure, celle du récepteur TAS2R46. La stimulation de cellules exprimant TAS2R43 avec des agonistes amers structurellement différents a permis d'identifier le (R) -citronellal en tant qu'inhibiteur allostérique général de TAS2R43. D'autres études de relation structure-activité ont indiqué que des aldéhydes aliphatiques ramifiés en 3-méthyle avec une chaîne carbonée d'au moins 4 atomes de carbone étaient les meilleurs antagonistes du TAS2R43 (Suess *et al.* 2018). Cette étude est la première à révéler l'influence des odorants sur la perception du goût amer au niveau des récepteurs. Alors que les interactions entre odeurs et goûts ont été principalement interprétées dans la littérature comme étant causées par une intégration neuronale centrale des odeurs et des goûts, plutôt que par des événements périphériques au niveau de la réception, ces résultats ouvrent une nouvelle dimension concernant l'interaction de ces deux sens chimiques.

III.4. Mécanisme de transduction du goût

III.4.1. Mécanismes généraux d'activation des RCPG de classe A

L'activation des récepteurs gustatifs par les stimuli sapides déclenche des mécanismes cellulaires complexes faisant intervenir de nombreux effecteurs. Le mécanisme de transduction du goût met en jeu des cascades de signalisation intracellulaires majeures qui ont été décrites en détails (Kikut-Ligaj and Trzcielinska-Lorych 2015, Margolskee 2002).

La principale voie de transduction proposée fait intervenir l'Inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) comme seconds messagers (**Figure 22**). La protéine G hétérotrimère est activée par le récepteur membranaire. Cette protéine G contient différentes sous-unités comme la Gα-gustducine (Kim *et al.* 2014, Spielman 1998), la Gα-transducine, la protéine Gα14 (Tizzano *et al.* 2008) ainsi que la Gβ3 ou Gβ1 et la Gγ13 (Huang *et al.* 1999). Au cours de l'étape suivante, le complexe hétérotrimérique est dissocié en deux sous-unités, Gα et Gβγ, et la sous-unité Gβγ va activer la phospholipase C (PLCβ2), ce qui conduit à la libération d'IP3 et du DAG comme seconds messagers. L'IP3 est alors reconnu au niveau des récepteurs IP3R3 situés dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'activation de ces récepteurs conduit à la libération de Ca^{2+} dans l'espace intracellulaire ce qui conduit à: (i) l'ouverture du canal TRPM5 (Transient Receptor Potential cation channel subfamily Melastatin

member 5) situé dans la membrane plasmique et l'entrée de cations dans la cellule puis sa dépolarisation (Damak *et al.* 2003) et (ii) en parallèle à la libération d'ATP comme neurotransmetteur (Taruno *et al.* 2013). L'ATP libéré par les cellules gustatives active les récepteurs purinergiques contenant les sous-unités P2X2 et P2X3 localisées sur les fibres nerveuses (Bo *et al.* 1999). Ces récepteurs sont essentiels à la transmission du signal gustatif car leur élimination sur des souris KO P2X2/P2X3 (Finger *et al.* 2005) ou l'inhibition pharmacologique des récepteurs P2X3 (Vandenbeuch *et al.* 2015) supprime totalement les réponses aux saveurs.

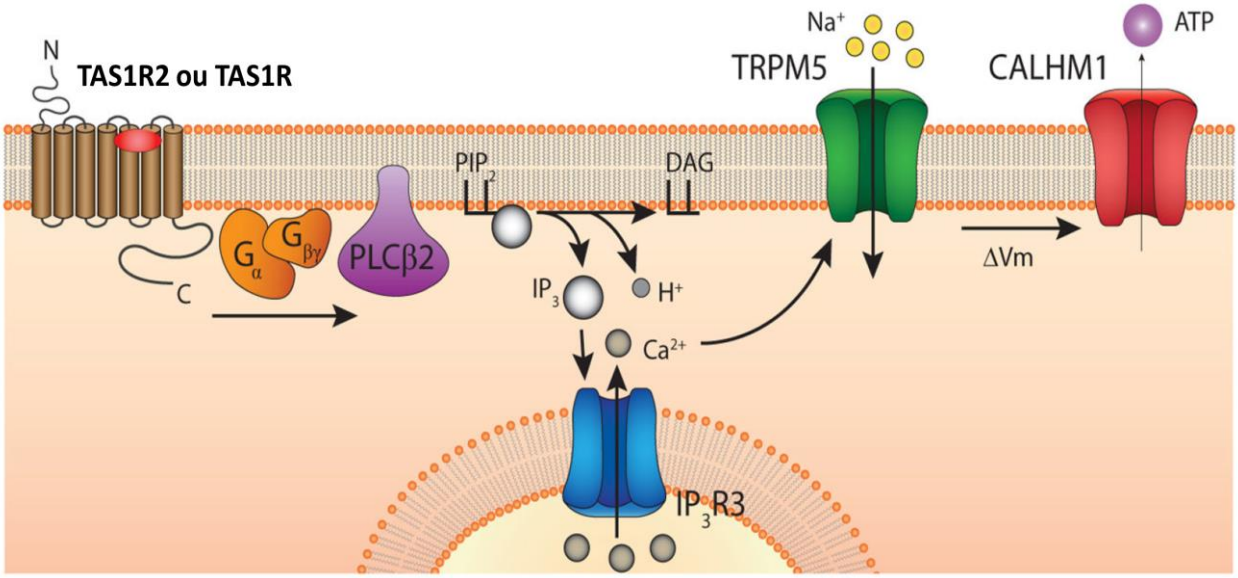

Figure 22 : Voie de signalisation cellulaire des cellules réceptrices du goût de type II.
La voie de la signalisation cellulaire des récepteurs TAS1R et TAS2R est similaire. La liaison du ligand active la voie de signalisation de la phospholipase C (PLC) qui entraîne la libération de stocks de calcium intracellulaire du réticulum endoplasmique qui aboutit à l'ouverture du canal TRPM5. Cela conduit à une dépolarisation de la cellule gustative qui entraîne l'ouverture des canaux CALMH1 et la libération d'ATP qui agit comme neurotransmetteur dans ces cellules (d'après Liman, 2014).

L'ATP est nécessaire en tant que neurotransmetteur pour activer les voies gustatives neurales afférentes. Cependant, le mécanisme de sa libération lors de la transduction du goût sucré, amer et umami n'a pas encore été complètement élucidé. Des études récentes confirment qu'un canal ionique voltage-dépendant CALHM1, identifié à l'origine comme modulateur de la signalisation calcique (Dreses-Werringloer *et al.* 2008), est crucial pour la libération d'ATP provoqué par les stimuli gustatifs au niveau des cellules gustatives de type II (Taruno *et al.* 2013). Les souris privées de CALHM1 ne sont d'ailleurs pas en mesure de percevoir les goûts sucré, amer et umami (Hellekant *et al.* 2015, Sclafani *et al.* 2014). Des études antérieures avaient montré que la communication de cellule à cellule dans les bourgeons gustatifs était dépendante de canaux pannexin 1 (Panx1) qui médient la libération

d'ATP (Dando and Roper 2009, Roper 2015). Cependant, ces données ont été remises en cause par des travaux plus récents conduits sur des souris KO pour Panx1 qui n'ont pas montré de différences de réponses au sucré par rapport aux souris sauvages (Tordoff *et al.* 2015, Vandenbeuch *et al.* 2015). Il reste donc à savoir si CALHM1 agit seul ou en combinaison avec d'autres canaux.

III.4.2. Mécanismes généraux d'activation des RCPG de classe C

Les structures cristallines résolues des DEC de mGluR, GABAB, CaSR et TAS1R chez le poisson médaka, ont permis une description plus précise de l'activation et de la liaison du ligand sur le domaine DEC. La liaison d'un ligand au DNT entraîne un changement structural qui constitue la première étape de l'activation du récepteur. Les agonistes se lient au DNT ouvert et interagissent principalement avec le lobe 1. Après liaison, le lobe 2 interagit avec l'agoniste favorisant et stabilisant une configuration fermée du récepteur. Ainsi, deux conformations principales de chaque DNT, ouverte (O) ou fermée (F) ont été observées (Geng *et al.* 2012, Kunishima *et al.* 2000, Muto *et al.* 2007a, O'Hara *et al.* 1993).

Il est important de noter que les récepteurs de classe C forment soit des homodimères (mGluR et CaSR) soit des hétérodimères (TAS1R et GABAB) reliés par des liaisons covalentes (ponts disulfures) ou non covalentes (interactions ioniques, liaisons de Van Der Waals). Cette dimérisation joue un rôle crucial dans leur activation. Par exemple, il a été montré que les deux DNT de mGluR-I_1 sont reliés par un pont disulfure formé entre les cystéines en position 140 (Kunishima *et al.* 2000). On notera que cette cystéine 140 est absente des TAS1R mais est conservée dans le récepteur au calcium CaSR. Sa mutation empêche la dimérisation et diminue la sensibilité de CaSR pour le calcium sans l'abolir démontrant l'existence d'autres interactions (Ray *et al.* 1998). La mutation des acides aminés au niveau du lobe 1 de mGluR-I_1 a permis d'identifier les résidus impliqués dans la dimérisation (Sato *et al.* 2003). Le récepteur de classe C sous sa forme dimérisée peut donc adopter quatre états conformationnels : un état complétement actif où les deux DNT sont sous forme fermée (F/F), deux états partiellement actifs ouvert-fermé (O/F) et fermé-ouvert (F/O), et un état inactif pour lequel les DNT sont ouverts (O/O). Dans ce dernier état, les deux lobes sont éloignés par répulsion électrostatique et forment un angle de 140° dégageant ainsi le site de liaison (**Figure 23**). La fixation du ligand qui stabilise la conformation fermée peut avoir lieu simultanément sur les deux DNT (Kunishima *et al.* 2000). Cependant, il a été montré aussi qu'un seul agoniste peut permettre d'activer le récepteur malgré la présence des deux sites de liaison possibles (Kniazeff *et al.* 2002).

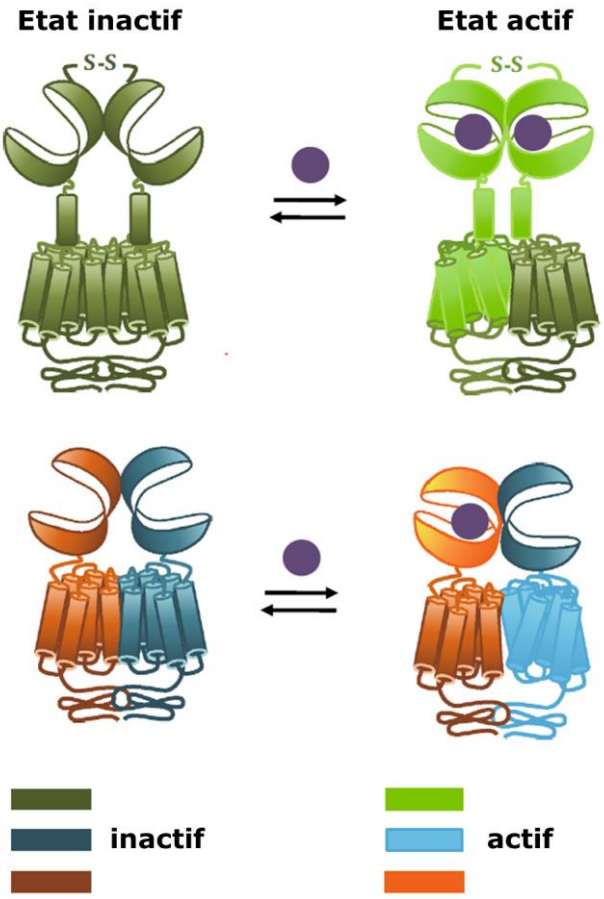

Figure 23 : Mécanismes moléculaires d'activation d'un homodimère et hétérodimère des RCPG de classe C.
Les homodimères et les hétérodimères subissent des changements de conformation lors de l'activation par un ligand (en violet). L'orientation relative des VFT du dimère est modifiée lors de la liaison de l'agoniste; les RRC (sauf pour le GABAB) se rapprochent et les dimères DTM changent de conformation de sorte qu'un seul DTM est à l'état actif (d'après Moller et al, 2017).

Les structures des DEC de dimères du mGluR et les analyses structure-fonction en transfert d'énergie de fluorescence par résonnance (FRET) de l'équipe de Jean-Philippe Pin (Institut de Génomique fonctionnelle, Montpellier) ont largement complété ces données en confirmant que les dimères DNT oscillent entre deux conformations majeures : la forme R stabilisée par les antagonistes, et la forme A stabilisée par les agonistes et nécessaire à l'activation. Leur modèle montre que l'activation du récepteur par un agoniste entraîne un mouvement de ciseaux entre les DNTs, conduisant à un réarrangement des RRC qui déclenche le réarrangement des deux DTM, menant à l'activation d'un seul DTM à la fois et au couplage à la protéine G intracellulaire (Rondard and Pin 2015) (**Figure 24**).

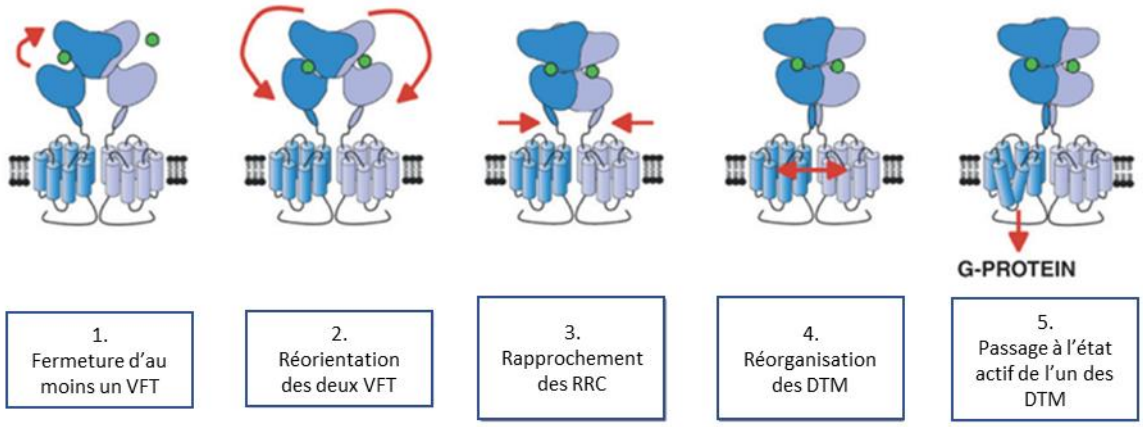

Figure 24 : Modèle d'activation d'un RCPG de classe C.
Représentation schématique de l'activation du mGluR conduisant à l'activation de la protéine G. La liaison du ligand au VFT stabilise la conformation fermée du DNT et son changement d'orientation, entraînant le changement de conformation des RRC puis des DTM. Un seul des DTM va activer la protéine G. VFT : Venus Flytrap ; DNT : domaine N-terminal ; RRC : région riche en cystéine ; DTM : domaine transmembranaire (d'après Rondard et al., 2015).

Plus précisément, l'étude de l'hétérodimère mGluR2/mGluR4 a montré qu'alors que les deux sous-unités sont capables d'activer les protéines G, seul le DTM de mGluR4 est capable de le faire dans l'hétéodimère mGluR2/mGluR4. Par ailleurs, la manipulation de la conformation de mGluR2 et mGluR4 par des modulateurs allostériques positifs ou négatifs peut réorienter l'asymétrie vers les protéines G. Ces études mettent en évidence de fortes interactions allostériques entre deux RCPG dans un complexe dimérique et démontrent la capacité différentielle de chaque DTM à atteindre un état d'activation de la protéine G (Liu *et al.* 2017, Moller *et al.* 2017).

Très récemment, en utilisant une combinaison de cristallographie aux rayons X, de microscopie cryo-électronique et d'études de signalisation, les travaux de Koehl et collaborateurs ont permis de décrire le mécanisme d'activation du récepteur mGluR5 (Koehl *et al.* 2019). Les résultats montrent que la liaison des agonistes au niveau des domaines VFT conduit à un compactage des sous-unités à l'interface des lobes du dimère, amenant ainsi les RRC situées à proximité à se repositionner pour relayer ce changement de conformation (**Figure 25 - 26 - 27**). Ensuite, les interactions rigides existantes entre les domaines riches en cystéine et les boucles ECL2 extracellulaires du DTM du récepteur permettent le

repositionnement des 7 domaines transmembranaires qui entrent en contact pour initier la signalisation.

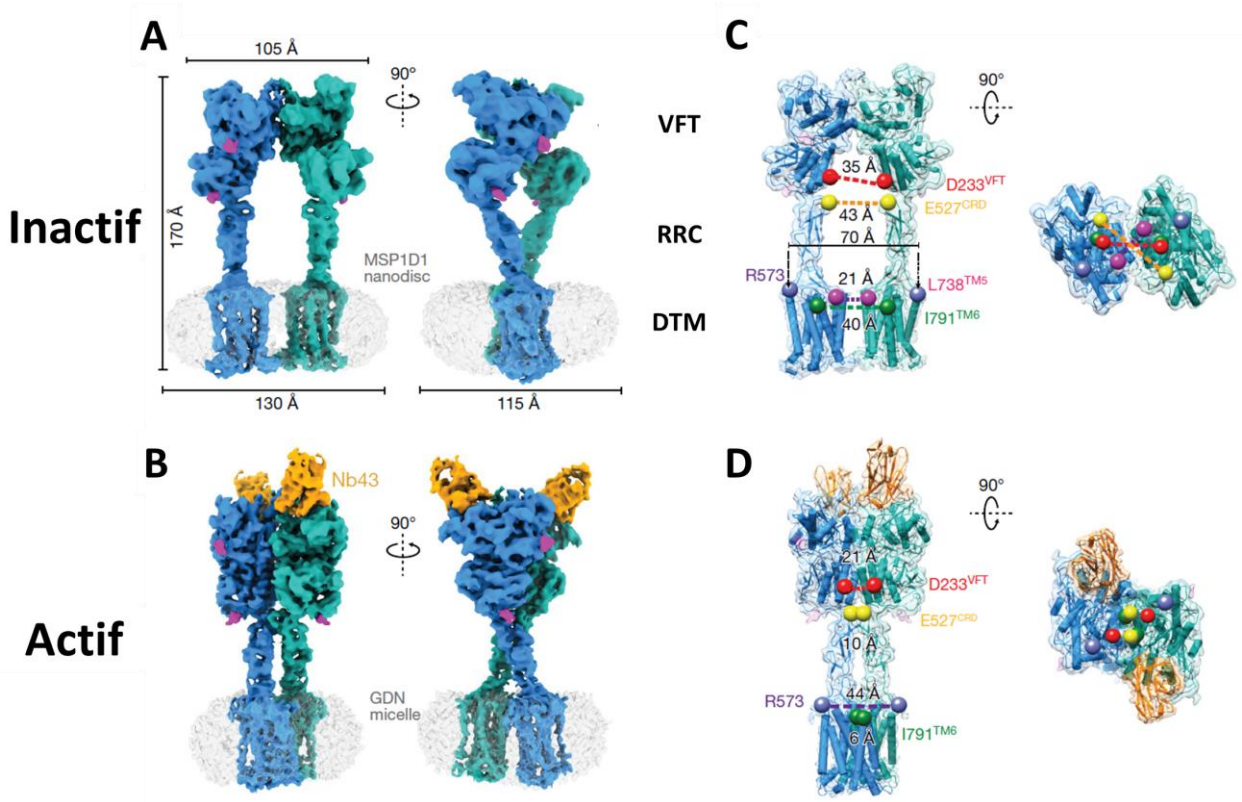

Figure 25 : Cartes et modèles moléculaires de mGluR5 obtenus par cryo-microscopie électronique (cryo-EM).
A et B : cartes cry-EM du mGluR5 à l'état inactif (A) et à l'état actif lié au nanobody Nb43 (jaune) et au ligand l-quisqualate (violet) (B). **C et D** : les modèles moléculaires actif (C) et inactif (D) de mGluR5 sont représentés vus de côté (à gauche) ou de haut (à droite). Les positions dans les domaines VFT (rouge), CRR (jaune), CRR/DTM (violet) et DTM (vert) indiquent que l'état actif est caractérisé par de plus petites distances inter sous-unités. La position TM5 dans le modèle inactif (rose) montre que, à leur point le plus proche, les DTM restent séparés. GDN : glyco-diosgenin, Nb43 : nanobody (anticorps de lama dirigé contre mGluR5, stabilisateur de l'état actif de mGluR5), MSP1D1 : nanodisque utilisé pour la solubilisation de mGluR5 (d'après Koehl, 2019).

Plus précisément, la liaison de l'agoniste conduit à la réduction de la distance entre les deux lobes de 35Å à 21Å au niveau de Asp233. La région riche en cystéine qui s'étend juste en dessous du VFT en direction de la membrane se rapproche de 43Å à 10Å au niveau de Glu527. Les deux DTM initialement distants de 21Å au niveau de leurs hélices TM5, les plus proches dans l'état inactif, se rapprochent l'un de l'autre par une rotation de 20° conduisant à

une nouvelle interface le long des hélices TM6 avec une séparation de seulement 6Å au niveau de Ile791.

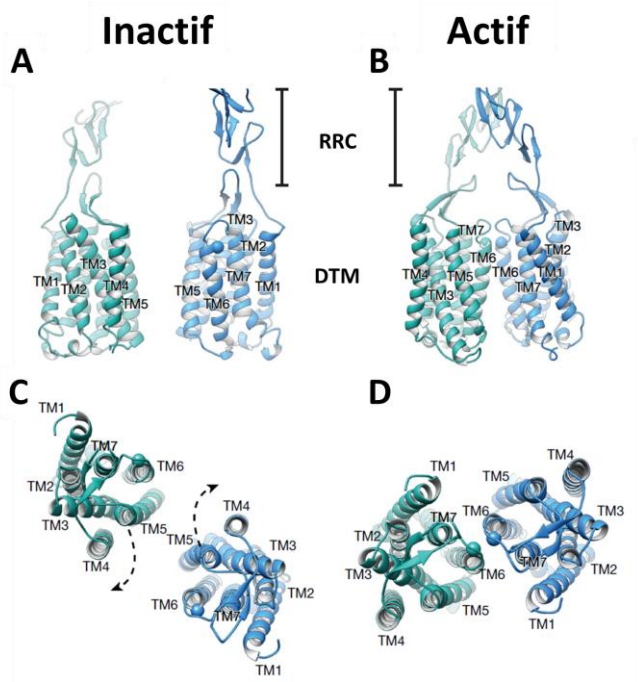

Figure 26 : Réarrangements de l'interface des DTM après activation du récepteur mGluR5.
Vues latérales (A, B) et supérieures (C, D) des DTM et RRC à l'état inactif (A, C) et à l'état activé. La position I791 dans le TM6 est représentée par une sphère à titre de référence. RRC : région riche en cystéine ; DTM : domaine transmembranaire (d'après Koehl et al., 2019).

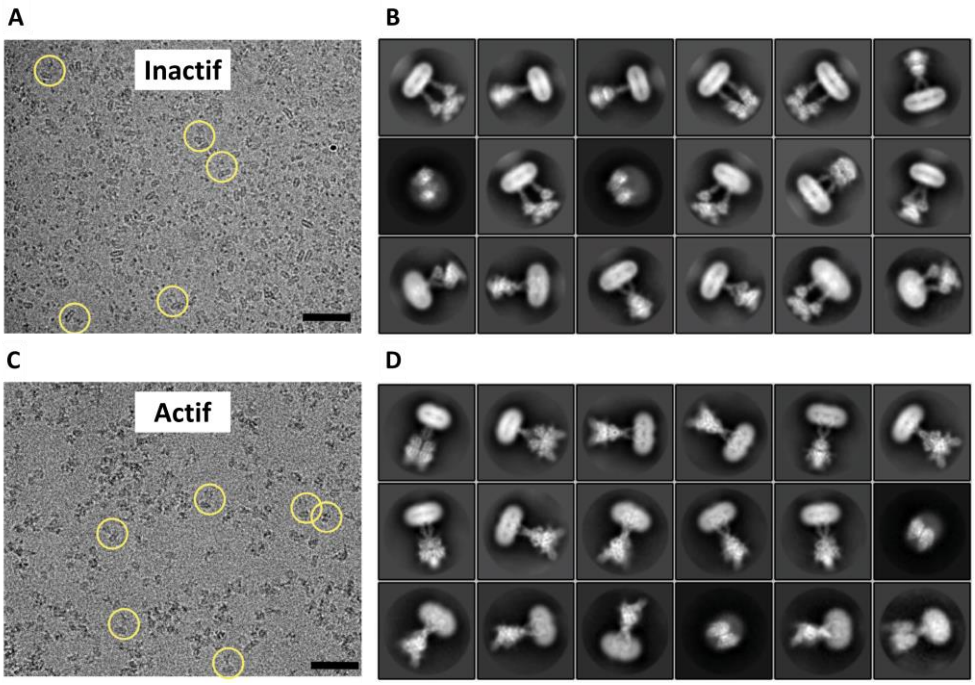

Figure 27 : Vues d'ensemble des images de cryo-EM de mGluR5.
A et C : Images représentatives de la cryo-EM du récepteur mGluR5 produit en nanodisques sous forme inactive (A) et activée (B) en présence de nanobodies Nb43 et du ligand l-quisqualate. B et D : images obtenues après classification, alignement et moyennage des images collectées par le logiciel Relion. Amélioration du rapport signal bruit et obtention de sous-classes plus homogènes permettant de séparer les différents états conformationnels de la protéine (d'après Koehl, 2019).

Des études de cinétique réalisées sur cellules vivantes par microscopie confocale et technique de FRET ont permis d'établir pour le récepteur mGluR1 que les réarrangements conformationnels des sous-unités suite à l'addition d'une forte concentration de ligand se produisaient en 1 à 2 ms. Ce changement rapide est suivi par un changement significativement plus lent pour les DTM d'environ 20 ms. Enfin, la désactivation du récepteur se produirait respectivement en environ 40 ms et 900 ms pour les changements de conformations inter- et intra- sous-unités (Grushevskyi *et al.* 2019).

Enfin, on notera que de nombreux autres travaux sont menés pour comprendre les mécanismes structuraux qui se déroulent ensuite lors de la transduction du signal du DTM à la protéine G hétérotrimérique (Dror *et al.* 2015, Du *et al.* 2019, Liu *et al.* 2019, Weis and Kobilka 2018).

III.5. Distribution tissulaire des récepteurs du goût

Les gènes *TAS1R* et *TAS2R* sont exprimés majoritairement au niveau des cellules gustatives présentes dans les bourgeons du goût. Le gène *TAS1R2* est exprimé de façon prédominante dans les papilles caliciformes et foliées. *TAS1R2* est exprimé plus rarement dans les papilles fongiformes et faiblement dans les bourgeons du goût situés au niveau du palais. Le gène codant la sous-unité TAS1R1 est exprimé principalement dans les bourgeons du goût situés au niveau du palais et des papilles fongiformes. Il est exprimé dans un plus faible pourcentage dans les papilles foliées et est rarement présent dans les papilles caliciformes (Hoon *et al.* 1999, Kitagawa *et al.* 2001, Montmayeur *et al.* 2001, Nelson *et al.* 2001). Plusieurs profils de coexpression ont été établis par double hybridation *in situ* chez la souris et le rat. Un premier profil a mis en évidence la coexpression des gènes *TAS1R1* et *TAS1R3* dans les bourgeons gustatifs du palais et des papilles fongiformes. Le gène *TAS1R3* est également exprimé en absence de *TAS1R1* et *TAS1R2* dans ces mêmes papilles. Enfin, un troisième profil a révélé la coexpression de *TAS1R2* et *TAS1R3* dans les bourgeons gustatifs du palais, des papilles caliciformes et foliées (Max *et al.* 2001, Montmayeur *et al.* 2001, Nelson *et al.* 2001). Par contre, il a été montré que les gènes *TAS1R1* et *TAS1R2* sont rarement coexprimés dans les mêmes cellules gustatives (Hoon *et al.* 1999, Nelson *et al.* 2001).

Les gènes codant les récepteurs à l'amer TAS2R sont exprimés au niveau des différentes papilles gustatives linguales et dans les bourgeons gustatifs du palais (Adler *et al.* 2000, Bufe *et al.* 2002, Kim *et al.* 2006, Matsunami *et al.* 2000, Ueda *et al.* 2001). Il a été estimé qu'approximativement 20% des cellules contenues dans un bourgeon du goût expriment des gènes *TAS2R* (Meyerhof 2005). Des expériences sur souris ont démontré que les TAS2R ne sont pas colocalisés avec les récepteurs TAS1R (goût sucré ou umami) mais sont exclusivement exprimés dans des cellules positives pour l'α-gustducine (Adler *et al.* 2000). Les expériences d'hybridation *in situ* combinant différentes sondes ont montré que chaque cellule gustative pouvait exprimer entre 2, 5, 10 gènes *TAS2R*, voir théoriquement l'ensemble du panel des gènes *TAS2R* (Adler *et al.* 2000). Cependant l'ARNm ne reflète pas forcément la présence des protéines. Plus vraisemblablement, d'autres expériences de colocalisation par hybridation *in situ* ont conclu que statistiquement pas plus de 4 à 11 *TAS2R* pouvaient être coexprimés dans une même cellule gustative (Behrens *et al.* 2007) suggérant une hétérogénéité dans la population des cellules gustatives exprimant les récepteurs TAS2R. Ces résultats sont en désaccord avec certaines observations qui ont montré que la plupart des cellules gustatives ne répondent qu'à un ou deux des cinq stimuli amers testés (Caicedo and Roper 2001) suggérant une population cellulaire plutôt homogène.

En plus de leur expression dans les cellules gustatives, la présence de *TAS1R* et *TAS2R* a été montrée dans d'autres tissus comme les tissus gastro-intestinaux, par exemple (**Figure 28**). Ainsi, les trois membres de la famille des TAS1R sont exprimés, chez l'Homme et la souris, dans l'estomac (Bezencon *et al.* 2007, Hass *et al.* 2010), au niveau du duodénum (Dyer *et al.* 2005, Margolskee *et al.* 2007), du jéjunum (Dyer *et al.* 2005) et du colon (Rozengurt 2006). L'expression de TAS1R3 a aussi été montrée dans les cellules endocrines intestinales (Rozengurt 2006), le foie , les cellules β du pancréas (Nakagawa *et al.* 2009). Bien que leur rôle physiologique reste à établir dans de nombreux organes, il a été proposé que TAS1R2/TAS1R3 est impliqué dans la régulation des processus métaboliques, tel que la détection de glucides, l'homéostasie du glucose et la libération d'hormones de satiété (Laffitte *et al.* 2014). La fonction métabolique de TAS1R2/TAS1R3 fait de ce récepteur une cible thérapeutique moléculaire potentielle pour le traitement du diabète de type 2 (Neiers *et al.* 2016). Les sous-populations de cellules gustatives, comme les glandes salivaires produisent des hormones métaboliques, notamment la leptine, la ghréline, le glucagon et le GLP-1 ou glucagon-like peptide. L'hétérodimère TAS1R2/TAS1R3 pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'absorption du glucose (Mace *et al.* 2009, Margolskee *et al.* 2007), la sécrétion d'insuline dans le pancréas mais également la sécrétion de polypeptides insulinotropes dépendants du glucose (GIP) et de GPL-1 dans l'intestin grêle (Jang *et al.* 2007, Kokrashvili *et al.* 2009, Murovets *et al.* 2015, Steinert *et al.* 2011). Des travaux récents sur souris ont

confirmé l'expression de GLP-1 dans des cellules exprimant TAS1R3 et son implication dans la transmission des stimuli sucrés. Une libération transitoire de GLP-1 a été mesurée sur les cellules gustatives stimulées par des composés sucrés. La libération de GLP-1 conduit à l'activation des fibres nerveuses. Cette activation est inhibée par un antagoniste de GLP-1, ce qui indique que GLP-1 est spécifiquement impliqué dans la transmission des signaux du goût sucré (Takai *et al.* 2015). Par ailleurs, il a été démontré que la leptine supprime la réponse au goût sucré des cellules gustatives via les récepteurs à la leptine et les canaux K_{ATP} (Kubasova *et al.* 2015). Des études menées par électrophysiologie ont montré que la leptine exerce un effet sélectif sur les cellules des bourgeons gustatifs exprimant TAS1R3 en supprimant la réponse aux édulcorants (Yoshida *et al.* 2015). Enfin récemment, l'impact du microbiote intestinal sur le récepteur du goût sucré a été évalué. Il a été démontré que les lipopolysaccharides dérivés de bactéries intestinales modulent les réponses des souris aux stimuli gustatifs sucrés. De plus, certains édulcorants artificiels induisent une intolérance au glucose en modifiant le microbiote intestinal (Suez *et al.* 2014). Dans ce contexte, on peut supposer que les récepteurs du goût sucré de l'intestin pourraient être impliqués dans l'intolérance au glucose induite par l'ingestion d'un édulcorant artificiel.

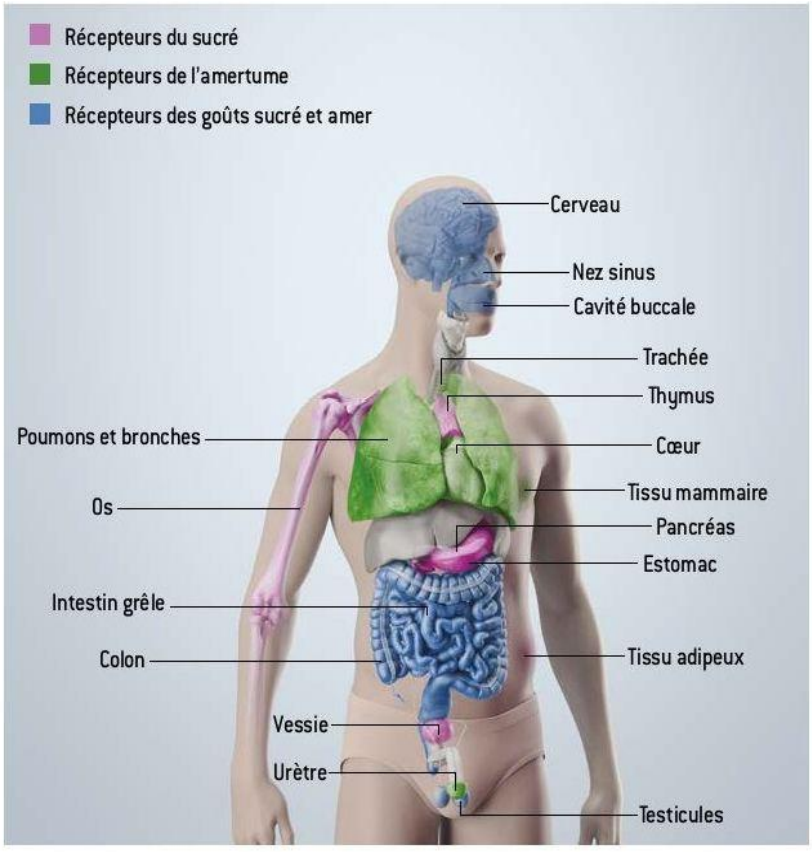

Figure 28 : Distribution tissulaire des récepteurs du goût.
(d'après Pour la Science, n°473, Mars 2017, p48-55).

L'expression des gènes *TAS2R* a été mise en évidence au niveau des voies respiratoires, de l'épithélium nasal jusqu'au poumon. Les cellules exprimant les TAS2R comprennent les cellules solitaires chimiosensorielles, les cellules épithéliales ciliées et les cellules des muscles lisses tapissant les voies respiratoires (Kinnamon 2012). L'application de composés amers sur l'épithélium nasal active le nerf trijumeau et induit des modifications de la fréquence respiratoire, suggérant que les cellules exprimant les TAS2R font partie des mécanismes de protection, lors de l'apnée et des éternuements, qui éliminent les substances irritantes inhalées (Finger *et al.* 2003). De même l'expression de *TAS2R* a été mise en évidence dans les voies digestives, notamment lors de stimulation gustative amère par voie intra gastrique. En effet l'administration intragastrique de dénatonium benzoate, une molécule très amère, diminue l'appétit et augmente la satiété en agissant sur la motilité gastro-intestinale, en diminuant la libération de motiline (Deloose *et al.* 2018, Deloose *et al.* 2017). Les TAS2R ont également été retrouvés dans des tissus extérieurs aux voies gustatives (Lu and Zhang 2017, Yamamoto and Ishimaru 2013), tels que le cœur (Foster *et al.* 2013), le cerveau (Singh *et al.* 2011) et les testicules (Li 2013).

Ces données suggèrent que leur rôle de détection des nutriments dans la cavité buccale ne représente pas la totalité de leurs capacités de signalisation. Des études récentes ont mis en évidence l'expression et la fonctionnalité des récepteurs TAS2R1 et TAS2R38 dans des kératinocytes humains montrant que ces récepteurs peuvent présenter un intérêt dermatologique et jouer un rôle dans la fonction barrière de la peau (Wolfle *et al.* 2015a, Wolfle *et al.* 2015b, Wolfle *et al.* 2015c, Wolfle *et al.* 2017). De plus, leur expression différentielle dans des pathologies telles que l'hypo- et l'hyperthyroïdie (Clark *et al.* 2015), la schizophrénie (Ansoleaga *et al.* 2015) et la maladie de Parkinson (Lu and Zhang 2017) suggère que les TAS2R pourraient s'avérer être des cibles thérapeutiques précieuses dans de multiples états pathologiques. L'expression des récepteurs du goût amer a également été documentée dans divers cancers. Des récepteurs du goût amer, comme TAS2R4 ont été identifiés dans les lignées cellulaires du cancer du sein MDAMB-231, MCF-7, MCF-10A (Singh *et al.* 2014) et dans des lignées cellulaires d'épithélium ovarien ou de cancer de la prostate (Martin *et al.* 2019). En outre, l'expression d'un autre récepteur du goût, TAS2R38, a été mise en évidence dans des gouttelettes lipidiques de biopsies tumorales d'un adénocarcinome canalaire pancréatique, ainsi que dans une lignée cellulaire dérivée du cancer du pancréas (Gaida *et al.* 2016).

De nombreuses recherches sont orientées sur le rôle que pourrait jouer les TAS2R au niveau de l'immunité via le microbiote intestinal. En effet, les découvertes récentes des cellules Tuft (cellules épithéliales intestinales chimiosensorielles, dites aussi cellules en brosse) ont montré que ces cellules étaient capables d'exploiter le signal de transduction du goût amer

pour déclencher la réponse immunitaire de type 2 contre des agents pathogènes souvent associée à des microbes symbiotiques (Gerbe and Jay 2016, Howitt *et al.* 2016, Prandi *et al.* 2018, von Moltke *et al.* 2016). Il a été proposé que les cellules Tuft détecteraient les molécules amères libérées par les parasites et sécrèteraient en retour de l'IL-25 ce qui augmente le nombre de cellules lymphoïdes (ILC2) et leur production de cytokines immunitaires de type 2 (IL-4 et IL-13) (Ekstrand *et al.* 2017, Lu and Zhang 2017). Cependant, il reste à déterminer quels sont les TAS2R impliqués.

III.6. Différences d'expression et polymorphisme des récepteurs

Une grande partie de la variabilité du goût entre les différentes espèces et parmi les individus au sein d'une espèce peut être attribuée au polymorphisme des gènes codant les récepteurs du goût. Ainsi, par exemple, l'insensibilité au sucré des félidés comme le chat, le guépard et le tigre est associée à la perte d'expression du gène *TAS1R2* (Li *et al.* 2005). Chez les chats, le gène *TAS1R2* est un pseudogène, ayant acquis au cours de l'évolution de multiples mutations rendant le récepteur inactif.

En général, les récepteurs qui ne présentent pas d'avantages évolutifs ont plus de chance d'être perdus, aucune pression de sélection ne contribuant à les maintenir. Ainsi dans les espèces dans lesquelles ils ne sont pas utilisés pour faire des choix alimentaires, ils peuvent disparaître ou leur nombre réduire, alors qu'une augmentation du nombre de récepteurs (pour les récepteurs amers) coïncide avec une expansion du régime alimentaire riche en végétaux. Par exemple, la pseudogénisation du récepteur du sucre, TAS1R2, s'est produite dans l'évolution de nombreux carnivores, pas seulement les chats, mais aussi chez les hyènes tachetées et certaines loutres (Jiang *et al.* 2012). À l'inverse, la sous-unité TAS1R1, composante du récepteur umami, est un pseudogène chez le panda géant, qui se nourrit exclusivement de bambou (Li *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2010). Chez certains animaux, notamment le lion de mer et le dauphin, les trois sous-unités impliquées dans les récepteurs du goût sucré et du goût d'umami sont pseudogénisées, conséquence probable d'un mode d'alimentation dans lequel les aliments sont avalés entiers (Jiang *et al.* 2012). La comparaison des récepteurs de l'amertume, du sucré et de l'umami sur un large éventail d'espèces animales a montré que ces différences inter-espèces étaient fréquentes (Shi and Zhang 2006). Néanmoins, la relation de cause à effet inverse reste aussi possible, à savoir, la perte de fonctionnalité du gène *TAS1R2* peut conduire à une perte du goût sucré et donc altérer le comportement alimentaire de ces animaux. Récemment, des travaux en bioinformatique sur la pseudogenisation (déclin du nombre de récepteurs du goût fonctionnels) de 35 gènes intervenant dans le goût, analysés sur 14 populations humaines de différentes ethnies, ont révélé une prévalence sans précédent de 25 variants de récepteurs gustatifs en perte de

fonction, identifiant ainsi l'un des cas les plus prononcés de diversité de population fonctionnelle dans le génome humain (Fujikura 2015). La fréquence des variants en perte de fonction dans les récepteurs du goût (2,1%) était considérablement plus élevée que la fréquence globale des pertes de fonctions dans le génome humain (0,16%). En particulier, les taux d'évolution moléculaire des récepteurs candidats acides (14,7%) et amers (1,8%) sont bien plus élevés chez l'Homme que ceux des récepteurs sucré (0,02%), salé (0,05%) et umami (0,17%) par rapport aux autres mammifères carnivores. De nombreux variants entraînant une perte de fonction sont spécifiques à une population (par exemple africaine, asiatique, américaine ou européenne), dont certains sont apparus même après cette divergence ethnique des populations (Fujikura 2015).

Il a été montré que la fonctionnalité des récepteurs aux goûts sucré, amer et umami est affectée par la présence de polymorphisme au niveau des gènes *TAS1R* et *TAS2R*. La plupart des variations observées sont des substitutions portant sur un seul nucléotide, variations appelées SNP pour *Single Nucleotide Polymorphism.* Des nombreuses études génétiques sur les récepteurs gustatifs ont établi un lien entre la variation génétique des récepteurs du goût et le risque de maladie chronique (Dotson *et al.* 2008). Cela peut être dû aux différences de perceptions gustatives, ce qui peut entraîner des différences dans les choix, les préférences, les habitudes et les apports alimentaires. Cette variation de l'apport alimentaire peut à son tour affecter le métabolisme et par conséquent la santé (Garcia-Bailo *et al.* 2009). De même la présence des récepteurs gustatifs dans de nombreux tissus extra-oraux soulève la question de leur rôle notamment dans la régulation du métabolisme (Laffitte *et al.* 2014).

Une étude du polymorphisme des trois gènes de *TAS1R* humains provenant de 88 individus originaires de huit régions géographiquement différentes, a mis en évidence quatorze SNP affectant la séquence protéique de TAS1R1, dix SNP pour TAS1R2 et six pour TAS1R3 (Kim *et al.* 2006). Quatre variations se situent dans le DNT de TAS1R2 et sont relativement proches du site de liaison principale des composés sucrés (Kim *et al.* 2006). Il a été proposé que ces substitutions soient à l'origine de différences de sensibilité interindividuelle aux molécules sucrées. La mutation I191V a été décrite comme étant associée à une augmentation de la consommation de sucre chez deux populations de personnes : obèses et en surpoids, (Eny *et al.* 2010). Plus récemment il a été montré que des adolescents obèses porteurs de l'allèle sérine du SNP rs9701796 dans *TAS1R2* (mutation S9C) présentaient un rapport tour de taille sur taille et une consommation de chocolat en poudre plus élevée, alors que ceux porteurs de l'allèle valine du SNP rs35874116 dans *TAS1R2* (mutation I191V) étaient caractérisés par un apport en fibres diététiques plus faible (Pioltine *et al.* 2018). La mutation SNP rs12033832 dans *TAS1R2* a été montrée comme affectant à la fois la perception du goût

sucré et la consommation de sucre, de manière dépendante de l'IMC. Ainsi les participants ayant un IMC supérieur à 25 ont une plus faible sensibilité au sucre, des seuils de détection plus élevés et une consommation de sucre plus importante (Dias *et al.* 2015). De plus, Fushan et collaborateurs ont révélé que les polymorphismes alléliques au sein du promoteur du gène *TAS1R3* étaient fortement corrélés à une diminution de la perception du saccharose chez l'homme (Fushan *et al.* 2009).

D'autres données concernant le polymorphisme du gène *TAS1R1* (Raliou *et al.* 2009b) indiquent que deux variants au niveau du DNT de TAS1R1 (A110V et A372T) sont prévalents chez des personnes qui ne perçoivent pas ou peu le goût du L-Glu. Par contre, les variations observées dans le gène *TAS1R3* apparaissent pour la plupart dans les domaines transmembranaires où sont situés les sites modulateurs allostériques. Les travaux de Shigemura et collaborateurs en système d'expression hétérologue ont confirmé les données sensorielles qui montrent que les mutations A372T dans *TAS1R1* entraînent une plus forte sensibilité au goût umami alors que la mutation R757C dans *TAS1R3* diminue la sensibilité au MSG et MSG plus IMP, confirmant que la variabilité génétique de l'hétérodimère TAS1R1/TAS1R3 affecte la sensibilité au goût umami (Shigemura *et al.* 2009b).

Un autre exemple concernant l'amertume, est la variation au sein de la population humaine en termes de sensibilité au phénylthiocarbamide (PTC), qui évoque un goût amer intense ou est insipide. Le PTC est détecté par le récepteur TAS2R38 pour lequel il existe deux allèles prédominants, l'un génère un récepteur sensible au PTC chez les personnes pouvant déguster le PTC et l'autre, un récepteur insensible au PTC chez les non-sensibles (Bufe *et al.* 2005, Kim *et al.* 2004). La raison pour laquelle l'allèle non-sensible a été maintenu est un mystère, c'est peut-être un récepteur fonctionnel amer, détectant un agoniste encore inconnu. De même, il a été montré que l'allèle du gène hTAS2R43 qui code pour une protéine avec un tryptophane en position 35, rend les personnes plus sensibles à l'amertume de l'aloïne et de l'acide aristolochique, deux composés présents dans certains végétaux. La même étude a montré que la sensibilité à l'amertume de la saccharine était chez l'Homme liée au polymorphisme de TAS2R43 et TAS2R44 (Pronin *et al.* 2007). Enfin, on notera aussi que chez certains individus, des gènes codant certains récepteurs à l'amer sont absents tels que TAS2R43 ou TAS2R45 (environ 18 % de la population pour ce dernier cas) (Pronin *et al.* 2007, Roudnitzky *et al.* 2011, Wooding *et al.* 2012).

IV. Approches expérimentales et méthodes d'études *in vitro* des récepteurs gustatifs

Les protéines membranaires représentent environ 30% de l'ensemble des séquences codantes du génome. Ces protéines sont d'une importance capitale pour les cellules vivantes. Elles sont impliquées dans des processus biologiques fondamentaux pour maintenir l'homéostasie cellulaire et coordonner l'activité cellulaire dans tout l'organisme. Elles jouent un rôle clef dans la transduction des signaux, convertissant les changements d'informations extracellulaires en changement de fonctions intracellulaires. Parmi elles, on distingue les RCPG qui constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Plus de 800 gènes codant les GPCR ont été identifiés à partir du génome humain séquencé (Fredriksson *et al.* 2003).

La diversité des ligands qui interagissent avec les RCPG est vaste et inclut des neurotransmetteurs, des métaux, des odorants, des molécules sapides, des acides gras, des acides aminés, des peptides, des protéines, des stéroïdes et la lumière. Leur dysfonctionnement est à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer, la mucoviscidose, l'épilepsie, l'hyper-insulinémie, les maladies cardio-vasculaires, l'hypertension et les maladies neurodégénératives. Cependant, les études sur ces maladies et d'autres, sont entravées par un manque de connaissances sur les protéines membranaires impliquées. Ainsi, connaître la structure de ces protéines membranaires et comprendre leurs mécanismes moléculaires présente non seulement un intérêt en biologie fondamentale, mais aussi un potentiel considérable d'amélioration de la santé humaine. Ceci est d'une importance primordiale pour l'industrie pharmaceutique qui produit de nombreux médicaments qui se lient aux protéines membranaires. En effet plus de 50% des médicaments ont actuellement leur mode d'action dirigé sur seulement environ une trentaine de RCPG alors que les protéines membranaires encodent pas moins de 800 gènes dans le génome humain. On comprend donc bien pourquoi l'industrie pharmaceutique et la recherche académique s'activent à mettre au point les méthodes et outils fiables pour relever ce challenge de la connaissance des RCPG et de la compréhension des interactions ligands-récepteurs.

Les programmes de recherche axés sur les RCPG reposent principalement sur une combinaison d'approches multidisciplinaires. Parmi elles, les tests cellulaires et méthodes de criblage à haut débit, dites HTS pour *High Throughput Screening* permettent d'étudier le fonctionnement des RCPG dans leur environnement moléculaire et cellulaire complexe, de décrypter les activités de récepteurs orphelins, d'identifier de nouvelles molécules. Associées à la mutagénèse dirigée des récepteurs, elles permettent de mesurer les interactions ligands récepteurs à l'échelle moléculaire et de valider les modèles de prédiction de structure *in silico*. La modélisation moléculaire basée sur les expériences *in silico* fait appel aux connaissances

précises de la stéréochimie des liaisons atomiques au sein des molécules et met en œuvre des outils informatiques puissants pour calculer et prédire les interactions. Elles s'alimentent des données structurales obtenues par cristallogenèse des protéines et des simulations dynamiques pour analyser les mouvements cellulaires. Ainsi chaque domaine de recherche contribue à améliorer nos connaissances des GPCR et leurs interactions récepteurs-ligands.

Dans ce chapitre, nous aborderons deux types approches *in vitro* utilisées pour l'étude des RCPG et plus particulièrement leur application aux récepteurs gustatifs : (i) la production et purification *in vitro* des récepteurs membranaires, (ii) l'expression fonctionnelle des RCPG sur cellules vivantes pour mesurer les interactions ligand-récepteur.

IV.1. Expression et purification des RCPG

Alors que des structures à haute résolution sont disponibles pour une myriade de protéines solubles, seulement 600 structures atomiques de protéines membranaires ont été obtenues jusqu'à présent, avec environ 300 structures déterminées au cours de ces 5 dernières années. Parmi elles seulement environ 10% concernent des protéines membranaires de vertébrés. Les premières protéines membranaires cristallisées ont été obtenues grâce à leur abondance naturelle, évitant ainsi toutes les difficultés associées à la surexpression. Cependant, la majorité des protéines membranaires pertinentes sur le plan médical et pharmaceutique sont présentes dans les cellules à de très faibles concentrations. L'expression des protéines membranaires recombinantes dans des systèmes hétérologues adaptés à la production à grande échelle apparaît donc comme un préalable indispensable aux études structurelles et fonctionnelles.

Ces dernières années, le panel de possibilités pour la production de protéines membranaires s'est élargi, allant des bactéries *E. coli* aux cellules de mammifères, en passant par d'autres bactéries, comme *Lactobacillus lactis*, des protozoaires comme *Leishmania tarentolae*, des levures, des cellules d'insectes, des ovocytes de Xenope et même des systèmes acellulaires, afin de créer le système d'expression le plus performant pour chaque protéine membranaire. En effet, les propriétés physico-chimiques des différentes protéines membranaires sont très différentes et il est donc difficile de prévoir la meilleure approche. Dans tous les cas, chaque système a ses avantages et ses inconvénients, et le choix du meilleur système permettant d'obtenir des quantités élevées de protéines fonctionnelles est souvent empirique.

Parallèlement aux progrès de production de protéines membranaires recombinantes, l'amélioration des stratégies de stabilisation des protéines membranaires en solution a contribué à résoudre un nombre croissant de structures. En effet, leur purification nécessite

l'utilisation de détergents pour extraire les protéines de la membrane et les maintenir en solution. De nombreuses protéines membranaires sont instables dans une solution contenant du détergent, et la recherche d'un détergent approprié et des conditions garantissant l'homogénéité, la fonctionnalité, la stabilité et la cristallisation des protéines est souvent une étape limitante et cruciale. De nombreux outils et de nouvelles stratégies dans le domaine des systèmes d'expression hétérologues et de stabilisation des protéines membranaires pour les analyses structurales et fonctionnelles sont encore en développement.

IV.1.1. Stratégie de surexpression des RCPG : différents systèmes d'expression

IV.1.1.1. Expression et production en bactéries Escherichia coli

La bactérie *E. coli* est le système d'expression et de production des protéines membranaires le plus utilisé. Le temps de génération du bacille est court, la souche a été atténuée et la manipulation peut être réalisée sans danger. Le système est simple, peu coûteux et les volumes de culture peuvent être aisément augmentés. Les rendements sont généralement élevés et la protéine exprimée est homogène du fait qu'il n'existe pas de modifications post-traductionnelles chez les bactéries. Cependant, cette absence de modifications post-traductionnelles peuvent être un facteur limitant lorsqu'elle sont essentielles à l'activité de la protéine

Les RCPG étant des protéines de la membrane plasmique, le ciblage des récepteurs recombinants sur la membrane interne de la bactérie est considéré comme la stratégie la plus évidente (**Figure 29**). Cependant cela conduit souvent à une toxicité cellulaire sévère et à de faibles niveaux d'expression. L'insertion dans la membrane interne bactérienne peut être plus efficace en fusionnant le RCPG à un partenaire auxiliaire protéique comme la β-galactosidase de *E. coli* (114 kDa), la maltose binding protein (MBP, 42 kDa), la Green Fluorescent Protein (GFP, 27 kDa), la glutathion S-transferase (GST, 25 kDa), la thioredoxine A (TRX, 10 kDa) (Baneres *et al.* 2011), la Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO, 12 kDa). Nie et collaborateurs ont été les premiers à montrer l'expression soluble des DNT de TAS1R2 et TAS1R3 de souris sous forme de protéine de fusion avec la MBP (Nie *et al.* 2005). La brazzéine a été produite avec succès avec la protéine SUMO par Assadi-Porter et al. (Assadi-Porter *et al.* 2008).

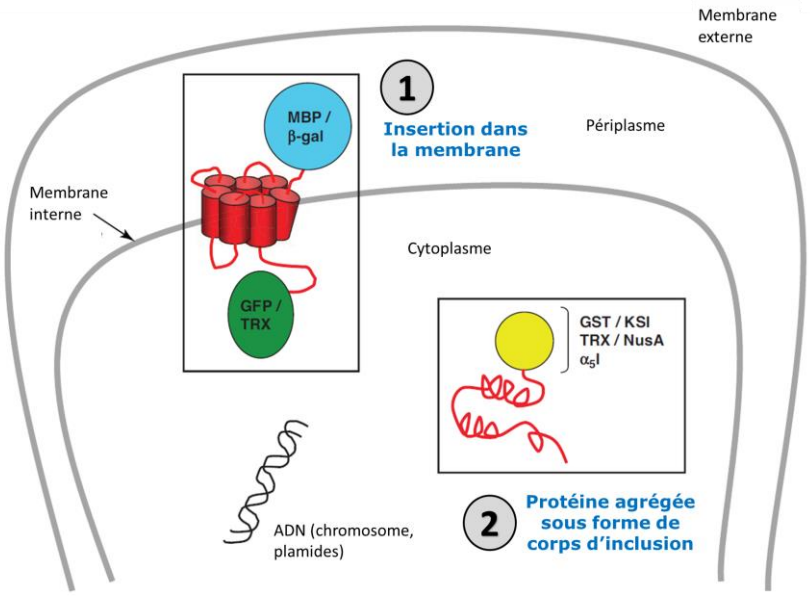

Figure 29 : Stratégie de surexpression des GPCR dans *Escherichia coli.*
Les GPCR peuvent être produits dans les bactéries soit par (1) insertion dans la membrane interne ou (2) accumulation dans des corps d'inclusion (CI). Dans le premier cas, un partenaire protéique est couplé à l'extrémité N-terminale comme la MBP Maltose Binding Protein, 43 kDa) ou la β-gal (β-galactosidase, 114 kDa) ou à l'extrémité C-terminale avec la GFP (Green Fluorescent Protein, 27 kDa) ou la TRX (thiorédoxine A, 10 kDa) du récepteur, ou aux deux extrémités (par exemple, MBP et TRX) pour cibler la protéine recombinante vers la membrane. Dans le second cas, la production sous forme de CI est favorisée par couplage à l'extrémité N-terminale d'un autre partenaire de fusion, tel que la GST (glutathion S-transférase, 25 kDa), KSI (kétosteroïde isomérase, 12 kDa), TRX, NusA (E. coli N-utilisation substance A, 50 kDa) ou α5I (fragment d'intégrine α5, 31 kDa). Les GPCR accumulés sous forme de CI ne sont pas correctement repliés et doivent être solubilisés dans des détergents agressifs avant d'être repliés (d'après Baneres, 2001).

Souvent, l'expression hétérologue de protéines membranaires dans *E. coli* est associée à un repliement incorrect de la protéine et à son accumulation dans le cytoplasme sous forme d'agrégats qu'on appelle corps d'inclusion (CI). Le ciblage de la production des RCPG sous forme de CI présente de nombreux avantages. Les CI peuvent être produits massivement par la cellule. Ils sont mécaniquement très stables et peuvent être facilement isolés des autres constituants cellulaires par centrifugation. Ils ne sont pas toxiques pour la bactérie et résistent à la dégradation protéolytique. Toutefois, cela implique que les récepteurs ainsi exprimés doivent être ensuite repliés dans leur état natif, ce qui constitue un important défi. Bien que certains RCPG puissent être surexprimés sans partenaire de fusion, dans de nombreux cas, celui-ci peut être à nouveau nécessaire pour une production efficace. Une étude sur plus de 100 RCPG a montré qu'en fonction des conditions de culture, GST et TRX étaient les partenaires de fusion les plus efficaces pour cibler les RCPG sur les CI (Michalke *et al.* 2009). Plus récemment, il a été montré que la fusion de la protéine SUMO pour la production du DNT de TAS1R2 et TAS1R3 de souris et d'Homme favorisait le repliement des récepteurs produits sous forme de corps d'inclusion (Assadi-Porter *et al.* 2018). Au laboratoire,

les travaux de thèse d'Elodie Maîtrepierre et Maude Sigoillot, ont démontré les interactions ligands sucrés et umami avec les DNTs de TAS1R2 et TAS1R3 produits par repliement de corps d'inclusion sans protéine de fusion (Laffitte *et al.* in preparation, Maitrepierre *et al.* 2012). Par la même méthode, nous avons mesuré les interactions de certains acides aminés avec le cT1R1-DNT du récepteur de chat au goût umami (Belloir *et al.* 2017b).

IV.1.1.2. Expression et production chez la levure

Il existe plus de 1500 espèces de levures connues mais une minorité seulement d'entre elles sont utilisées pour l'expression et la production de protéines membranaires recombinantes. Les deux plus couramment utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris* (Bawa *et al.* 2011, Bonander and Bill 2012, Darby *et al.* 2012, Emmerstorfer-Augustin *et al.* 2019, Routledge *et al.* 2016). Les levures sont des cellules eucaryotes unicellulaires qui combinent de nombreux avantages. Les levures se multiplient rapidement dans des milieux de culture peu onéreux et dans des conditions de cultures équivalentes à celles des bactéries ((Bill 2014). Les principaux paramètres influençant la croissance et le niveau de production des protéines recombinantes sont classiques : la composition du milieu, la température, le pH et le degré d'oxygénation du milieu. Les levures peuvent facilement être manipulées génétiquement et elles réalisent la plupart des modifications post-traductionnelles présentes chez les eucaryotes supérieurs telles que la formation des ponts disulfures ou les N- et O-glycosylations. Cependant, une hyper glycosylation des protéines et l'absence de cholestérol membranaire (remplacé par de l'ergostérol) sont deux désavantages qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur le repliement, la stabilité ou l'activité de certaines protéines membranaires recombinantes.

Pour pallier à ces inconvénients lors de la production de protéines humaines, certaines souches de levure ont été « humanisées », c'est-à-dire génétiquement modifiées pour leur conférer des caractéristiques biologiques et biochimiques proches de l'Homme, notamment pour modifier leur capacité de modifications post-traductionnelles ou pour enrichir leur membrane en cholestérol au lieu d'ergostérol. Ainsi, des travaux menés sur la levure *Pichia pastoris* (reclassifiée comme *Komagataella pastoris)* ont permis d'inactiver quatre gènes de glycosylation spécifiques de la levure et d'en réintroduire 14 autres afin de reproduire les étapes séquentielles de la glycosylation humaine (Hamilton *et al.* 2006). De même la création d'une souche modifiée de *S. cerevisiae* dans laquelle la voie de biosynthèse a été entièrement reconstituée a permis d'obtenir une levure capable de fabriquer des stérols analogues au cholestérol. Les auteurs ont démontré que cette modification doublait, voir triplait, la capacité de la levure à produire des RCPG dont l'activité est souvent cholestérol dépendante (Kitson *et al.* 2011).

L'utilisation de la levure *S. cerevisiae* offre l'avantage d'être très bien documentée en termes de littérature mais aussi du point de vue de sa génétique qui est bien maitrisée. On trouve pour *S. cerevisiae* la plus large gamme de souches et d'outils biologiques spécifiques développés par les sources commerciales ou académiques (Cartwright *et al.* 2016). La levure *P. pastoris* offre quant à elle deux avantages spécifiques : elle peut être cultivée à très haute densité et elle est capable de métaboliser le méthanol. En effet si on diminue ses apports préférentiels en source de carbone, comme le sucre ou le glycérol, elle est capable d'utiliser le méthanol comme source unique de carbone, ce qui stimule fortement l'expression des gènes impliqués dans sa dégradation métabolique et son utilisation comme source d'énergie et de biomasse (Hartmann *et al.* 2016). De plus, le méthanol constitue un inducteur d'expression puissant et peu coûteux.

Les premières structures de protéines membranaires produites à partir de levure ont été obtenues en 2005 avec : l'ATPase-Ca^{2+} dite SERCA1a du lapin, surexprimée chez *S. cerevisiae* et le canal potassique voltage dépendant Kv1.2 du rat produit chez *P. pastoris* (*Jidenko et al. 2005*) Plus récemment les résolutions des structures des protéines membranaires comme l'aquaporine 2, la bestrophin-1, le canal TRAAK channel, la leukotriene C4 synthase et la P-glycoprotein ont été réalisées après surexpression en *P. pastoris* (Routledge *et al.* 2016). La levure *P. pastoris* a été très utilisée pour la production des protéines sucrées (Masuda *et al.* 2016) comme la brazzéine (Poirier *et al.* 2012), la monelline (Cai *et al.* 2016, Jia *et al.* 2017, Liu *et al.* 2015) la thaumatine (Healey *et al.* 2017, Ide *et al.* 2007) et la gurmarine, petite protéine inhibitrice du goût sucré (Sigoillot *et al.* 2015). En 2009, Sugawara et collaborateurs ont produit les 25 TAS2R humains par fusion avec la GFP en levure *S. cerevisiae* (*Sugawara et al. 2009*). Après optimisation des paramètres de production, ils ont obtenu environ 1 mg des récepteurs TAS2R7, TAS2R8, TAS2R16, TAS2R41 et TAS2R48 par litre de culture. Bien que le récepteur TAS2R41 semblait le plus soluble et homogène pour envisager des études structurales par cristallisation aucune structure n'a été identifiée à ce jour (Sugawara *et al.* 2009).

IV.1.1.3. Expression et production dans les cellules d'insectes

La production de protéines recombinantes par des cellules d'insectes repose sur leur infection par un baculovirus recombinant. Les baculovirus sont des virus à ADN double brin (80-180 kbp) en forme de bâtonnets, enveloppés par une nucléocapside empaquetée dans une matrice de polyhédrine. La souche de baculovirus la plus utilisée est *Autographa californica* Multiple Nuclear polyhedrosis virus (*Ac*MNPV). Les baculovirus infectent spécifiquement les invertébrés de la classe des Arthropodes comme les insectes et les crustacés, leur manipulation est donc sans danger pour les vertébrés ou les végétaux. Les

lignées de cellules d'insectes utilisées pour l'infection et la production des protéines recombinantes sont les cellules *Sf9* ou *Sf21* dérivées de *Spodoptera frugiperda* et les cellules High five (Hi5) issues de *Trichoplusia ni*. L'infection des cellules d'insectes se déroule en quatre étapes. La phase dite « immédiate » (0-4 h post infection) correspondant à l'entrée du virus par endocytose, vient ensuite la phase « précoce » (4-7 h) de réplication de l'ADN. La phase tardive (7-24 h) est plus longue et correspond à la production des protéines de la nucléocapside pendant laquelle des baculovirus sont libérés permettant une infection secondaire. Durant la phase « très tardive » (24 h et jusqu'à la mort cellulaire) les gènes codant la polyhedrine ou p10 sont surexprimés ce qui en fait des promoteurs « tardifs » intéressants pour l'expression des protéines recombinantes auxquelles ils sont associés. Au final, les virus qui ont produit la protéine s'accumulent dans le noyau de la cellule et sont libérés par lyse cellulaire (McKenzie and Abbott 2018). Ainsi le système baculovirus/cellules d'insectes est un système d'expression très utilisé, relativement peu coûteux, facile à manipuler et à incrémenter en termes de volume, ce qui permet de produire en quantité et en qualité des protéines membranaires. Les fournisseurs proposent un nombre important de constructions plasmidiques pour l'expression et faciliter la purification des RCPG produits par baculovirus (Saarenpaa *et al.* 2015). Pour autant, chez les cellules d'insectes, la glycosylation des protéines est limitée souvent à l'addition de mannose et la membrane plasmique des cellules contient un faible taux de cholestérol. Comme pour les levures, ces problèmes ont été en partie résolus en adaptant génétiquement les lignées par introduction de glycosyl transférases humaines (Jarvis *et al.* 1998) ou en ajoutant du cholestérol dans le milieu de culture (Marheineke *et al.* 1998).

Bien que certains récepteurs de classe A, tels que les récepteurs β1 et β2 adrénergiques, la D3 dopamine, et de classe C, comme mGluR1 et mGluR5 aient été produits en baculovirus/cellules d'insectes pour des études structurales (Milic and Veprintsev 2015), peu de données sont disponibles pour la production de récepteurs gustatifs dans ce système d'expression. Les travaux de Sainz et collaborateurs ont utilisé l'expression de différents récepteurs chimériques rhodopsine-mTAS2R produits en baculovirus-Sf9 pour mettre en évidence les interactions des récepteurs mTAS2R5, hTAS2R7, hTAS2R14, hTAS2R43 et hTAS2R47 avec 17 molécules amères (Sainz *et al.* 2007). De même le récepteur de souris mTAS2R5 et la gustducine ont été exprimés en baculovirus pour mesurer les interactions GTPγs induites par le cycloheximide (Chandrashekar *et al.* 2000). Plus récemment, la structure tridimensionnelle des DNT de l'hétérodimère TAS1R2/TAS1R3 du poisson médaka a été résolue (Nuemket *et al.* 2017). L'expression constitutive des domaines extracellulaires TAS1R2 et TAS1R3 a été obtenue après clonage des gènes d'intérêt dans les plasmides pAc5.1 et pCoBlast adaptés à l'expression en cellules d'insectes, et leur transfection stable

dans des cellules S2 de *Drosophila melanogaster* cultivées dans du milieu Express Five™ SFM (Nango *et al.* 2016).

IV.1.1.4. Système d'expression en cellules Eucaryotes

Les cellules de mammifères représentent le système idéal d'expression et de production des RCPG puisqu'elles correspondent à l'environnement naturel des récepteurs. Les lignées cellulaires les plus utilisées pour l'expression en stable des protéines recombinantes sont des clones dérivés de HEK293 (Human Embryonic Kidney) ou de CHO (Chinese Hamster Ovary). Ces lignées initialement adhérentes ont été adaptées pour une croissance en suspension à haute densité et elles sont facilement transfectables. Il existe une grande quantité de milieux commerciaux pour leur croissance dont certains sont dépourvus de sérum. Les lignées peuvent aussi être utilisées dans les systèmes d'expression par baculovirus lorsque certaines protéines membranaires requièrent des modifications post-traductionnelles et un environnement lipidique natif qui rendent l'expression en cellules d'insectes non utilisable (Goehring *et al.* 2014). Certaines lignées ont été créées pour une intégration ciblée du transgène facilitant ainsi le clonage (Flp-In™-293, Flp-In™-T-REx®-293, and Flp-In™-CHO) (Hacker and Balasubramanian 2016). D'autres lignées cellulaires sont déficientes en glycosylation (HEK293S-GnTI$^-$, HEK293Glyco delete et CHO lec1) et surexpriment de façon stable le répresseur à la tétracycline (TetR) pour induire l'expression des protéines (T-REx®-293 et T-REx™-CHO).

C'est le cas de la lignée de cellules HEK293S-Gnti$^-$ mise au point par Reeves et collaborateurs, qui a intégré de façon stable le gène TetR par transfection du plasmide pcDNA6™/TR lui conférant sa résistance à la blasticidine (Reeves *et al.* 2002a, Reeves *et al.* 2002b). Ce plasmide fait partie pour moitié du système d'expression T-REX™ (Life technologies) qui a été mis au point pour l'expression de gènes inductibles par la tétracycline chez les cellules de mammifères. Le gène TetR code pour un répresseur protéique de 207 acides aminés (23 kDa) sous le contrôle du promoteur CMV (cytomegalovirus). La deuxième partie du système T-REX™ est constituée des plasmides pcDNA4/TO ou pcDNA5/TO dans lesquels peuvent être insérés les gènes codant pour les récepteurs protéiques à exprimer (**Figure 30**).

De nombreux travaux ont été publiés sur les cellules CHO car cette lignée est privilégiée pour la production de protéines recombinantes à visées thérapeutiques. Cependant, c'est la lignée HEK293S-GnTI$^-$ déficiente en N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI) (Reeves *et al.* 2002b) qui a démontré ses capacités à produire des récepteurs membranaires sensoriels tels que la rhodopsine et les récepteurs olfactifs OR17-40 (Cook *et al.* 2008, Cook *et al.* 2009) et OR1A1 (Belloir *et al.* 2017a).

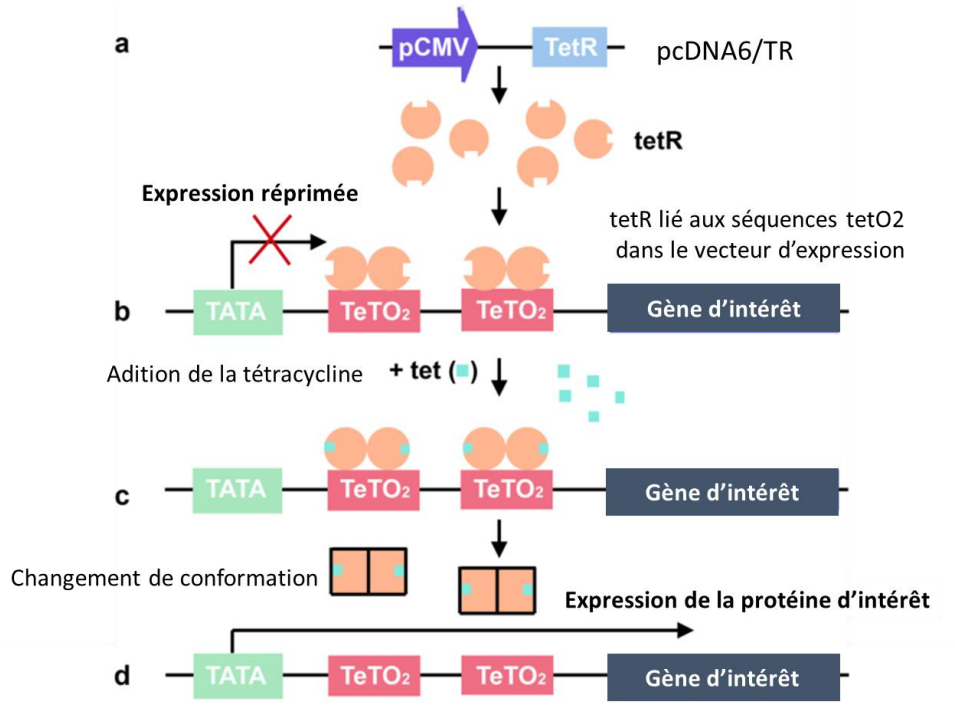

Figure 30 : Schéma du mode d'induction par la tétracycline dans la lignée HEK293S GnTI- inductible

L'expression des gènes est contrôlée par le promoteur CMV dans lequel deux copies codant la séquence de l'opérateur TetO2 (19 nucléotides par TetO) ont été insérées en tandem. Ces séquences servent de site de fixation pour 2 molécules de répresseur Tet. En absence de tétracycline, le répresseur Tet forme un homodimère qui se lie avec une affinité extrêmement élevée à chaque séquence TetO2 dans le promoteur du vecteur d'expression inductible. Les deux sites TetO2 dans le promoteur du vecteur d'expression inductible servent de sites de liaison pour 4 molécules (ou 2 homodimères) du répresseur Tet. La liaison des homodimères répresseurs Tet aux séquences TetO2 réprime la transcription du gène d'intérêt. Lors de son addition, la tétracycline se lie avec une haute affinité à chaque homodimère du répresseur Tet et provoque un changement conformationnel dans le répresseur qui le rend incapable de se lier à l'opérateur TetO2. Le complexe répresseur TetR-tétracycline se dissocie alors de l'opérateur TetO2 et permet l'induction de la transcription du gène d'intérêt.

IV.1.1.1. Système d'expression acellulaire in vitro

Depuis quelques années, il existe sur le marché des systèmes d'expression dits « cell-free » dans lesquels l'expression de protéines est réalisée sans l'utilisation de cellules vivantes. Au lieu de cela, tous les composants nécessaires pour transcrire l'ADN en ARN et traduire l'ARN en protéine (par exemple, des ribosomes, des ARNt, des enzymes, des cofacteurs, des acides aminés) sont fournis en solution pour une utilisation *in vitro*. Généralement, de telles solutions sont obtenues en fabriquant un lysat cellulaire à partir d'un type de cellules bactériennes ou eucaryotes.

Les systèmes acellulaires ne sont généralement pas pratiques pour l'expression de protéines à grande échelle. Cependant, ils sont souvent parfaitement adaptés à un certain nombre d'applications où la génération rapide d'une plus petite quantité de protéine recombinante est souhaitable. Ils offrent l'avantage d'un environnement de synthèse ouvert qui permet de manipuler et d'optimiser directement divers additifs, cofacteurs, enzymes (Segers and Masure 2015). Par ailleurs, l'expression sans cellule convient au criblage à haut débit de protéines tronquées pour des études structurales ou fonctionnelles. D'autres applications pour l'expression sans cellule incluent la fabrication de protéines toxiques pour les hôtes d'expression *in vivo*, l'expression de protéines avec des acides aminés modifiés, l'incorporation de modifications post-traductionnelles ou des études sur le repliement des protéines dans différents détergents, lipides, nanodisques et autres composés amphiphiles (Isaksson *et al.* 2012, Kimura-Soyema *et al.* 2014, Reckel *et al.* 2010, Rues *et al.* 2014, Schneider *et al.* 2010). Toutefois, en raison de l'absence d'appareil de Golgi, seules sont réalisées les N-glycosylations de base dans les systèmes acellulaires. Cela peut être favorable en diminuant l'hétérogénéité des structures obtenues mais peut aussi se révéler préjudiciable à l'activité du récepteur quand ces glycosylations sont indispensables à son fonctionnement. Enfin, la structure de la protéine produite peut être homogène mais différente et correspondre à une forme non fonctionnelle du récepteur (Shilling *et al.* 2017).

Parmi, les récepteurs membranaires de classe A, le β2-adrénergique a été produit avec succès en système acellulaire (Wang *et al.* 2017). Comparé à la production en levure ou en baculovirus qui atteignent 1,2 à 20 mg/L de membrane brute, le système acellulaire a permis d'atteindre 1,1mg/mL de récepteur parfaitement replié, en présence du détergent Bjr35, en seulement 6 heures, ce qui démontre un niveau d'expression supérieur. Les travaux de Sonnabend et collaborateurs ont démontré que la production du récepteur de classe C mGluR1 était réalisable en système acellulaire avec un rendement toutefois assez faible d'environ 2,5µg/mL (Sonnabend *et al.* 2017). A ce jour cependant, aucun article à ma connaissance, n'a été publié sur la production de récepteurs gustatifs en système d'expression acellulaire.

IV.1.2. Solubilisation et purification des RCPG

IV.1.2.1. Importance du choix du détergent :

La première étape de purification d'une protéine membranaire nécessite au préalable la solubilisation des membranes plasmiques. Cette étape est réalisée à l'aide de détergents qui solubilisent les lipides et les composants hydrophobes. Les détergents appartiennent à une classe de composés appelés surfactants, qui sont des agents tensioactifs qui réduisent la

tension superficielle interfaciale dans les mélanges (comme l'huile et l'eau) en s'adsorbant aux interfaces (Rosen and Kunjappu 2012, Seddon *et al.* 2004). Les détergents jouent donc un rôle essentiel, leur nature amphiphile (tête hydrophile et queue hydrophobe) leur permet d'interagir avec la région hydrophobe membranaire des récepteurs pour les maintenir solubles dans l'eau en dehors de leur bicouche lipidique native. Les détergents sont capables d'insérer leurs queues hydrophobes dans la membrane lipidique, perturbant ainsi cette dernière et finalement avec une concentration croissante de détergent, ils permettent l'extraction des protéines membranaires (Lee *et al.* 2016). Malheureusement, la solubilité ne conduit pas toujours à l'obtention d'une structure native fonctionnelle et à l'inverse certains détergents qui permettent d'atteindre cette stabilité ne sont pas compatibles avec les études biochimiques mises en œuvre ultérieurement. Il n'y a donc pas de règle et il faut évaluer au cas par cas les différents détergents (Chattopadhyay *et al.* 2015, Naranjo *et al.* 2016, Sarramegna *et al.* 2006)

La région hydrophile des détergents peut être catégorisée en 3 groupes : ioniques (anion ou cation), non ioniques et zwitterioniques (**Figure 31**). Les détergents ioniques tels que le SDS sont généralement très puissants et très efficaces pour extraire les protéines membranaires mais ont fortement tendance à dénaturer les protéines en cassant les liaisons intra et intermoléculaires.

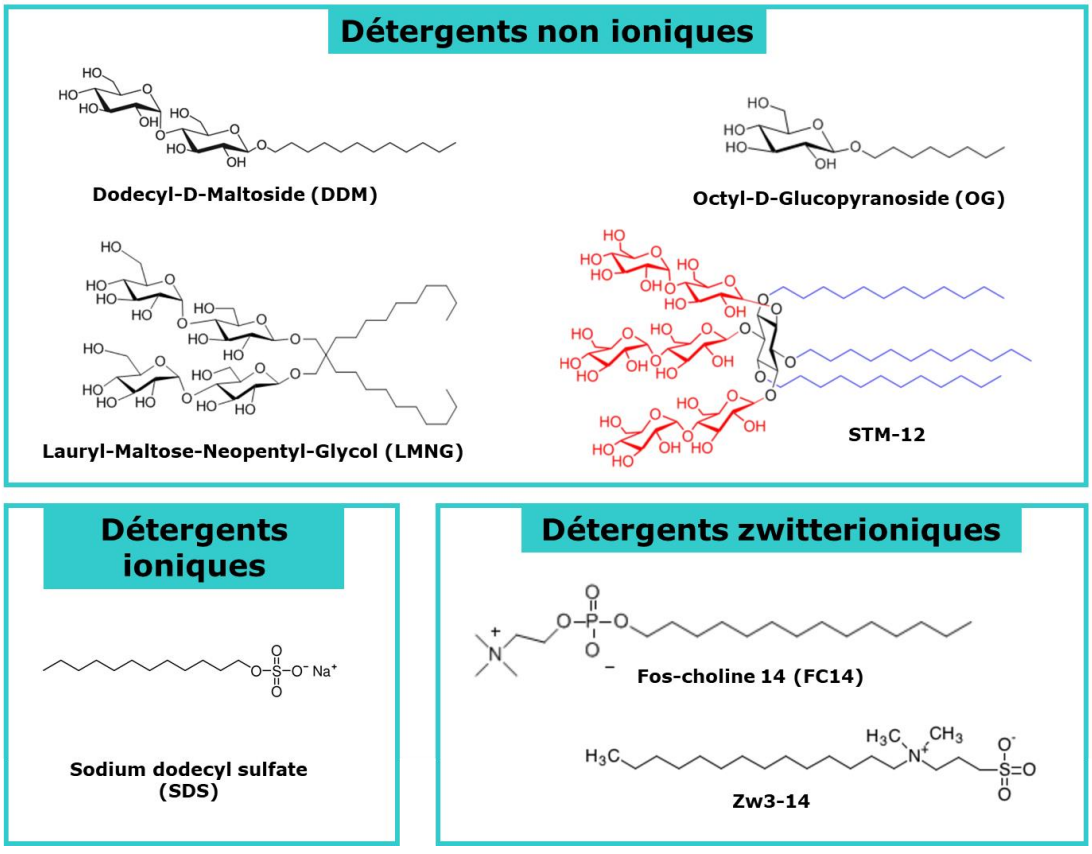

Figure 31 : Structure chimique de quelques détergents utilisés pour solubiliser les protéines membranaires.

Les détergents non ioniques (par exemple : le Dodecyl-D-Maltoside (DDM), l'Octyl-glucopyranoside (OG), le Lauryl-Maltose-Neopentyl-Glycol (LMNG)) sont caractérisés par une tête hydrophile non chargée généralement composée d'un sucre (maltosides ou glucosides) ou de polyéthylène glycol. Ces détergents sont non dénaturants car ils perturbent surtout les interactions protéines-lipides et lipides-lipides plutôt que les interactions protéines-protéines. Les détergents zwitterioniques (comme : Zw3-14, le Fos-Choline 14 (FC14) et le N-Dimethylamine-N-Oxyde (LDAO)) portent une charge positive et une charge négative, leur charge globale est nulle comme les détergents non ioniques mais ils sont capables d'agir sur les interactions protéines-protéines et sont donc classés comme intermédiaires dans leur pouvoir de solubilisation. Actuellement, une attention particulière est portée sur les détergents dérivés du LMNG qui semblent offrir en plus d'une bonne solubilisation, une meilleure stabilité et fonctionnalité des récepteurs membranaires purifiés. Les dérivés amphiphiles asymétriques contenant deux chaînes alkyl de longueurs différentes forment d'une part des micelles plus petites et d'autre part stabilisent favorablement les protéines membranaires (Bae and Du 2019). Ainsi de nouveaux détergents sont synthétisés tel que le scyllo-inositol glycoside dénommé STM-12 qui semble le plus prometteur (Sadaf *et al.* 2019).

On notera le cas particulier de la solubilisation des corps d'inclusion. Les corps d'inclusion ne sont pas des membranes biologiques mais des agrégats qui ne peuvent être solubilisés qu'avec des détergents ioniques forts tels que le SDS ou des agents chaotropes comme l'urée ou le chlorure de guanidium. La renaturation des protéines produites en corps d'inclusion consiste à remplacer l'agent dénaturant par un détergent doux pour obtenir le repliement de la protéine dans sa forme native et fonctionnelle. Cette étape, encore appelée « repliement » peut se révéler difficile.

Enfin, l'autre partie de la molécule de détergent est polaire, il peut se former spontanément des micelles (assemblages pseudo-sphériques) dès que la concentration critique micellaire (CMC) est atteinte. Ainsi en dessous de la valeur de la CMC, les molécules sont principalement présentes en tant que monomères, et au-dessus de la CMC, elles forment des micelles caractérisées par leur nombre d'agrégations (nombre de monomère de détergent présent dans la micelle). La CMC est dépendante de la concentration en sels, de la température, du pH et de la quantité de lipides initialement présente, ces paramètres doivent donc être bien maitrisés. Les détergents forment donc une sorte de ceinture plus ou moins volumineuse autour de la région hydrophobe du récepteur initialement enchâssée dans la bicouche lipidique (le Maire *et al.* 2000). Le volume occupé est directement lié à la longueur des molécules de détergents et à sa CMC. Plus la CMC est basse, plus ce volume est important et plus il sera difficile d'échanger ce détergent par un autre. Pour la phase d'extraction et de solubilisation des membranes protéiques la concentration de solubilisation

critique (CSC) est un paramètre important. C'est la concentration minimale de détergent nécessaire pour disperser le système membranaire sous forme micellaire. Généralement les détergents sont utilisés à 0,5-2% (m/v) pour la solubilisation, cependant les RCPG sont peu stables à ces fortes concentrations et le détergent est graduellement ramené à des concentrations plus faibles pendant les phases ultérieures de purification (Milic and Veprintsev 2015). Il est cependant important de garder la protéine membranaire extraite au-dessus de la CMC (2-3 fois la CMC). En effet, la diminution de la concentration en détergent sous la CMC entraîne une dissociation des complexes protéines-détergents qui conduit généralement à l'agrégation irréversible de la protéine.

Finalement les récepteurs membranaires solubilisés ne sont pas des protéines isolées et homogènes mais des complexes regroupant détergents et lipides membranaires qui possèdent des propriétés physicochimiques particulières (diamètre, volume, masse). L'étape d'extraction et de solubilisation est donc suivie par des méthodes de purification pour séparer les différents constituants de l'échantillon solubilisé.

IV.1.2.1. Fragilité des RCPG et systèmes de stabilisation in vitro

Pour empêcher l'agrégation des protéines membranaires au cours de l'étape de solubilisation, diverses stratégies peuvent être réalisées afin d'améliorer la stabilité et la fonctionnalité des RCPG. En effet, certains détergents peuvent créer un désordre structural lorsque les paramètres environnementaux changent ou diminuer l'activité de la protéine et entraîner des artéfacts. Divers outils peuvent être introduits pour remplacer l'utilisation des détergents conventionnels. Parmi eux, quatre méthodes ont été plus largement utilisées et mises à profit pour la résolution des structures moléculaires.

Les amphipols (Apols) sont des polymères amphiphiles courts qui peuvent remplacer les détergents pour maintenir les protéines membranaires solubles dans l'eau (Le Bon *et al.* 2018, Popot *et al.* 2011, Tribet *et al.* 1996, Zoonens and Popot 2014) (**Figure 32**). Ainsi le complexe protéine-Apol se comporte quasiment comme une protéine hydrosoluble classique, facilitant sa manipulation pour les études fonctionnelles et structurales. Les Apols peuvent être utilisés pour maintenir le repliement natif de certains RCPG en solution et être échangés avec le détergent initial de solubilisation, ou bien ils peuvent directement participer au repliement de la protéine lorsqu'elle est produite à partir de corps d'inclusion (Dahmane *et al.* 2009). Le plus utilisé des amphipols est le A8-35 dont les propriétés de solubilisation ne sont pas affectées par le greffage de petites molécules. De ce fait différentes formes d'Apols ont été créées pour les fonctionnaliser. C'est notamment le cas des Apols fluorescents portant différents fluorophores ou des APols greffés avec une étiquette d'affinité telles que la biotine, la poly-histidine, des groupes imidazole ou un désoynucléotides qui permettent d'immobiliser

les protéines membranaires sur un support solide et d'élargir le champ des applications possibles en recherche fondamentale et appliquée (Le Bon *et al.* 2018).

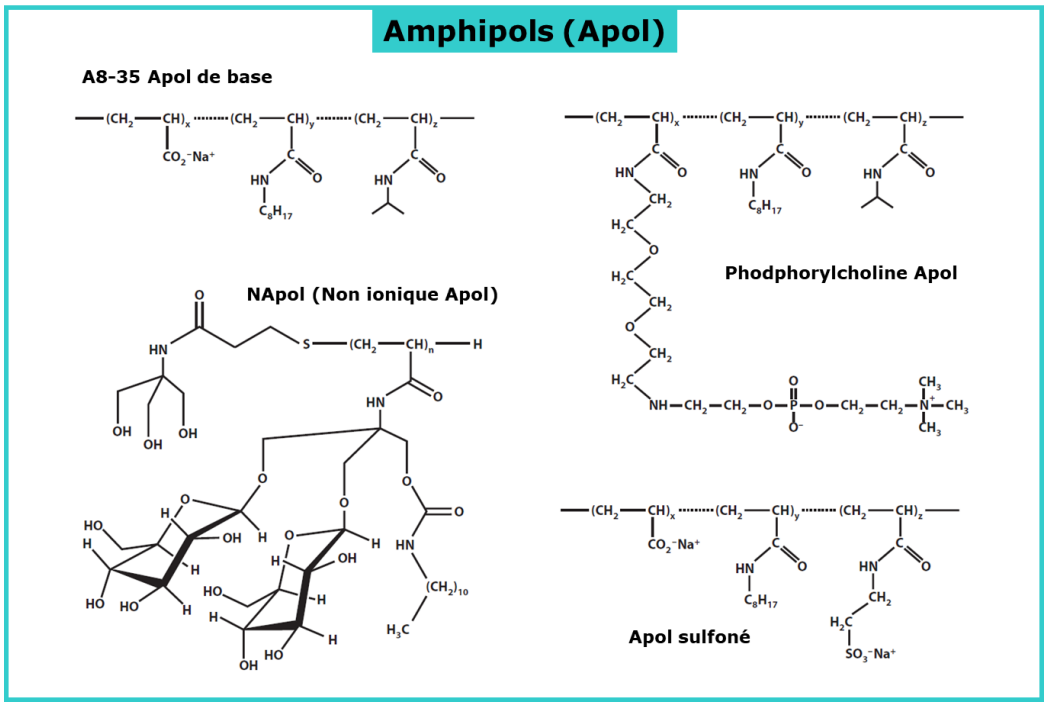

Figure 32 : Structure chimique des amphipols (Apol).

Les bicelles sont des structures discoïdales composées d'une bicouche lipidique stabilisée par des lipides à chaîne courte ou par des détergents particuliers. Dans le cas des nanodisques la structure en bicouche est stabilisée par des lipoprotéines appelées MSP (Membrane Scaffolding Protein) qui miment l'environnement phospholipidiques de la membrane lipidique. La protéine membranaire est accessible par chacune des faces rendant possible les études d'interactions avec différents ligands (Skrzypek *et al.* 2018). Cependant la préparation des nanodisques peut être délicate car l'obtention des MSP nécessite une étape de production par système recombinant et des étapes de solubilisation-purification faisant elles-mêmes appel à des détergents (Faas *et al.* 2018). De plus la composition en lipides exogènes utilisés pour les nanodisques, bien que rigoureusement établie, peut différer des lipides natifs. Enfin la présence de structures en hélices α des MSP peut interférer dans les mesures structurales ultérieures.

Ces dernières années, les copolymères de styrènes et d'acide maléique (Styrene–Maleic Acid copolymers, SMAs), principalement utilisés dans l'industrie plastique, sont devenus l'un des outils le plus prometteur pour la solubilisation des protéines membranaires. En jouant sur le ratio styrène:acide maléique, généralement de 2:1 et 3:1, on augmente l'hydrophobicité du polymère. Les SMAs agissent différemment par rapport aux détergents

classiques. Ces molécules amphipathiques sont capables de solubiliser spontanément les bicouches lipidiques sous la forme de particules discoïdales d'un diamètre d'environ 10 nm. Ainsi, les protéines membranaires peuvent être directement extraites des cellules sous une forme soluble dans l'eau tout en conservant une partie de membrane et de lipides natifs autour d'elles (Dorr *et al.* 2016, Dorr *et al.* 2017, Knowles *et al.* 2009, Stroud *et al.* 2018). Ces particules sont appelées SMA–lipid particles (SMALPs) (Knowles *et al.* 2009) ou lipodiscs particles (Orwick *et al.* 2012) ou native nanodiscs (Dorr *et al.* 2014). Les SMAs présentent cependant quelques limitations dont les plus gênantes sont l'impossibilité de travailler en conditions acides ou en présence de concentrations millimolaires d'ions magnésium ou calcium. En 2015, Jahmad et collaborateurs ont rapporté la première solubilisation et purification d'un RCPG, le récepteur humain à l'adénosine A2A (A2AR), en absence totale de détergent (Jamshad *et al.* 2015). Cette étude a montré que l'encapsulation spontanée du récepteur membranaire par un SMA conférait au récepteur une thermostabilité accrue d'environ 5°C par rapport à une production en DDM, une stabilité à 4°C sur une longue période et une résistante aux cycles de congélation/décongélation (Jamshad *et al.* 2015, Wheatley *et al.* 2016). L'étude sur deux autres RCPG, les récepteurs de la mélatonine et de la ghréline, a démontré que les RCPG stabilisés dans les disques lipidiques SMA non seulement reconnaissent leur ligand en subissant tous les changements spécifiques de conformation médiés par un ligand, mais sont également capables d'activer leurs protéines G couplées et recruter des arrestines d'une manière dépendante de l'agoniste (Logez *et al.* 2016).

IV.1.2.2. Purification par chromatographie

Après leur solubilisation et éventuelle stabilisation, les récepteurs membranaires peuvent être purifiés par différentes techniques de chromatographie qui sont généralement combinées. Ces techniques permettent de séparer les protéines selon leurs propriétés spécifiques. Ainsi, la chromatographie échangeuse d'ions ou « Ion EXchange chromatography » (IEX) permet de séparer les protéines selon leurs différences de charge en utilisant des résines chargées de façon opposée. En effet, la charge globale d'une protéine varie selon son pH environnant. Le pH auquel la charge nette est nulle est appelé point isolélectrique (pI). Pour des pH supérieurs à pI, la protéine sera retenue par une résine échangeuse d'anions (chargée positivement). Inversement, pour des pH inférieurs à pI, on utilisera une résine échangeuse de cations. On utilise donc un changement ou gradient de pH pour éluer les protéines selon leur charge.

La chromatographie d'interactions hydrophobes ou «Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) et la chromatographie inverse (Reversed Phase Chromatography,

RPC) séparent les protéines en fonction de leur différence d'hydrophobicité au niveau de leur surface et le caractère hydrophobe de la résine greffée. Cette interaction hydrophobe est dépendante de la présence de sels dans le tampon, une concentration élevée en sel améliorant généralement l'interaction hydrophobe. Les protéines sont initialement chargées sur la colonne dans un tampon riche en sels. Au fur et à mesure que la force ionique du tampon diminue pendant l'élution, les protéines sont éluées par hydrophobicité croissante.

Parmi ces méthodes, la chromatographie d'affinité est une technique spécifique basée sur une interaction biologique entre deux molécules. Typiquement l'interaction est réversible et la purification est obtenue à travers une interaction biphasique entre une des molécules (le ligand) immobilisée sur une matrice solide (agarose ou cellulose chimiquement inerte greffée chimiquement avec un effecteur qui présente une affinité biologique pour le soluté à analyser) tandis que l'autre partenaire (la protéine à purifier) est dans la phase mobile complexe. L'étape de capture est généralement suivie par une phase de lavage puis d'élution.

Trois types d'affinité sont utilisées : l'affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps. Afin d'améliorer la sélectivité des interactions de capture, des systèmes d'étiquettes dits « tag » ont été développés (Johnson 2019). Ces étiquettes sont intégrées initialement dans la construction du vecteur d'expression de la protéine d'intérêt en position N- ou C-terminale sous forme de peptides ou de protéines de fusion. Les étiquettes peuvent être classées en étiquettes peptidiques et en étiquettes protéiques. Par exemple les étiquettes GST, GFP et MBP sont des étiquettes protéiques qui favorisent la solubilité mais leur taille (plus de 25 kDa) peut affecter la fonction de la protéine d'intérêt, nécessitant souvent leur élimination avant l'analyse. En revanche, les étiquettes peptidiques sont plus petites (1 à 2 kDa) et moins susceptibles d'altérer la fonction de la protéine cible et leur retrait n'est pas toujours nécessaire (Malhotra 2009). Parmi les marqueurs peptidiques les plus utilisés on trouve l'étiquette His-tag constituée de 6 ou 10 histidines successives, FLAG-tag (DYKDDDK) (Hopp *et al.* 1988), HA-tag (YPYDVPDYA) (Field *et al.* 1988), STREP-tag (WSHPQFEK) (Schmidt and Skerra 1994), Myc-tag (EQKLISEED) (Evan *et al.* 1985), V5-tag (GKPIPNPLLGLDST) pour les plus connus, mais aussi SUMO (Bird 2011), PA-tag (GVAMPGAEDDVV) (Fujii *et al.* 2014), TARGET-tag (Tabata *et al.* 2010), AGIA-tag (EEAAGIARP) (Yano *et al.* 2016), MAP-tag (GDGMVPPGIEDK) (Fujii *et al.* 2016). Cette liste, loin d'être exhaustive, s'enrichit régulièrement de nouvelles étiquettes ayant pour objectifs d'obtenir une plus forte affinité pour une meilleure capture de la protéine d'intérêt en un minimum d'étapes, voire idéalement une seule. C'est par exemple le cas du CL7-tag, récemment publié, dont l'affinité est de 10^{-14} à 10^{-17} M comparé à un His-tag ou FLAG-tag dont l'affinité est d'environ 10^{-8} à 10^{-9} M, et qui offre l'avantage de résister à de fortes concentrations en sels et en détergents (Vassylyeva *et al.* 2017).

Les fournisseurs ont mis au point des colonnes prêtes à l'emploi, faciles d'utilisation et régénérables. C'est le cas par exemple des colonnes d'affinité IMAC (Immobilised Metal Affinity Chromatography) pour lesquelles la séparation des protéines est fondée sur l'interaction des étiquettes His-Tag présentes au niveau des extrémités de la protéine d'intérêt avec les ions métalliques (nickel ou cobalt), immobilisés de manière covalente à une matrice d'agarose réticulée. L'élution se fait par ajout d'imidazole qui entre en compétition avec les histidines. Les billes d'agarose peuvent aussi être utilisées en « batch » c'est-à-dire sous forme libre en mélange avec les protéines à séparer. C'est le cas par exemple du système de billes EZview Red anti-FLAG M2, pour lequel les billes d'agarose sont greffées de façon covalente avec l'anticorps anti-FLAG. L'élution est réalisée à l'aide d'un peptide par compétition. Les étapes peuvent dans ce cas être facilitées par l'utilisation de billes colorées ou aimantées. La chromatographie d'affinité, comme les chromatographies IEX et HIC permettent aussi de concentrer les échantillons protéiques purifiés.

Enfin, la chromatographie d'exclusion de taille (Size Exclusion Chromatography, SEC) encore appelée gel filtration, permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. C'est la plus simple des chromatographies et la plus douce des techniques car les molécules ne se lient pas à la résine et le tampon n'affecte pas directement la résolution. La résine est constituée de billes poreuses dans lesquelles les petites protéines peuvent pénétrer, tandis que les plus grosses en sont exclues et seront donc éluées rapidement. La gel filtration est généralement utilisée en dernière intention pour améliorer la pureté de la protéine (étape de « polishing »). L'élution est une étape au cours de laquelle la composition du tampon peut être échangée. A l'inverse la SEC conduit souvent à une dilution des échantillons dans les fractions collectées.

Toutes ces méthodes ont été utilisées avec plus ou moins de succès par différents auteurs pour purifier les protéines membranaires dont les récepteurs gustatifs. Les travaux de Nie et collaborateurs ont été les premiers à mesurer les interactions du récepteur au goût sucré de souris avec le glucose, le sucrose et le sucralose (Nie *et al.* 2005). Deux stratégies ont été utilisées pour produire les sous-unités du récepteur sucré sous forme soluble (**Figure 33**). La protéine recombinante contenait soit une étiquette FLAG et intéine en position C-terminale, soit la sous-unité TAS1R-DNT a été fusionnée avec la maltose-binding protein (MBP) en position N-terminale pour augmenter sa solubilité. Dans le premier cas, la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité à la chitine (New England Biolabs). En effet, la construction a été réalisée et intégrée dans le plasmide pTXB1 en amont de l'étiquette Intéine-tag (28 kDa). Cette étiquette est elle-même, associée au domaine de fixation de la chitine en position C-terminale (Chitin Binding Domain, CBD, 6 kDa) et a été modifiée au niveau de son extrémité N-terminale pour subir un clivage induit par un thiol comme le DTT (1,4-

Dithiothréitol). Ainsi, les protéines étiquetées ont été chargées sur la colonne et retenues par la chitine greffée. Le clivage de la protéine a été réalisé à 4°C en présence de DTT pendant 24h en colonne statique. La protéine TAS1R3-DNT a été éluée par reprise du flux.

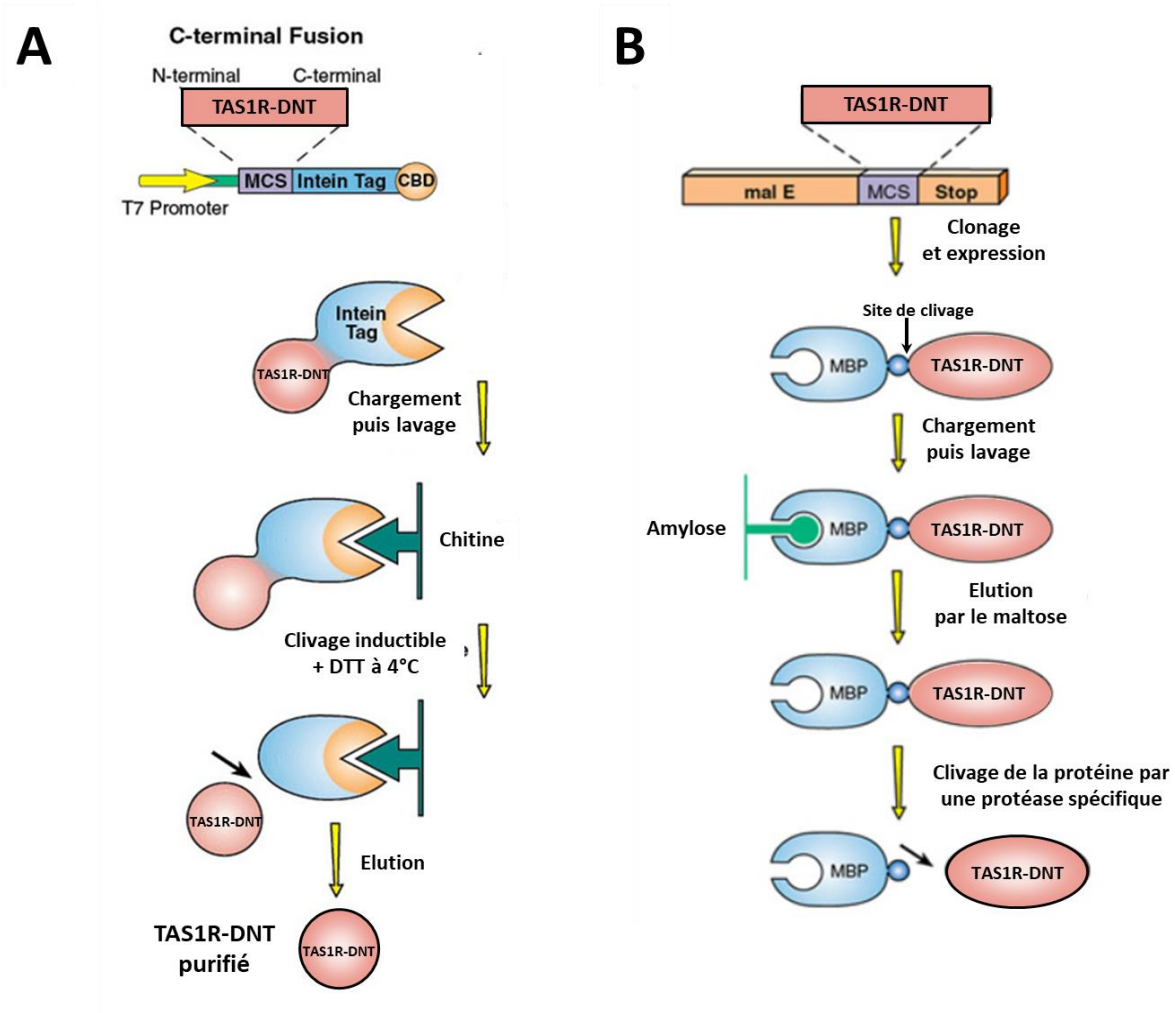

Figure 33 : Illustration schématique de la chromatographie d'affinité chitine (A) et MBP.
MBP : Maltose Binding Protein ; CBD : chitin binding domain ; DTT : dithiothréitol (image d'après News England BioLabs).

Dans le deuxième cas, pour les protéines de fusion MBP-TAS1R2-DNT et MBP-TAS1R3-DNT, chacun des gènes des sous-unités a été fusionné en aval du gène malE codant la MBP. Les protéines MBP-mTAS1Rs-DNT produites en *E. coli* ont été purifiées par chromatographie d'affinité amylose, résine spécifique pour capturer les MBP-protéines. Après élution par le maltose, les protéines MBP-mTAS1Rs-DNT sont purifiées par une chromatographie échangeuse d'anions (colonne HiTrap Q sepharose XL, Amersham-

Pharmacia). Finalement les auteurs ont remarqué que la protéine TAS1R2-DNT était peu soluble en absence de la protéine de fusion MBP.

Depuis les années 2010 notre laboratoire a mis au point la production et purification des DNT de hTAS1R3 (Maitrepierre *et al.* 2012), cT1R1 (Belloir *et al.* 2017b), mTAS1R2 et hTAS1R2 (Laffitte *et al.* in preparation) à partir des corps d'inclusion (CI) produits en *E. coli*. Les corps d'inclusion sont des agrégats protéiques non ordonnés. La surexpression des protéines en CI offre cependant de nombreux avantages comme l'obtention de grandes quantités de protéines. Les CI peuvent être facilement isolés grâce à leur différence de densité et de taille comparée aux contaminants cellulaires. Par ailleurs les protéines synthétisées sous forme de CI sont moins sensibles à la dégradation protéolytique. Enfin la protéine d'intérêt présente souvent un degré de pureté important réduisant le nombre d'étapes de purification. A l'inverse les protocoles de repliement dans son état natif de la protéine d'intérêt peuvent s'avérer longs et laborieux. Généralement, après diverses phases de solubilisation, la protéine est repliée par dialyse en présence de détergents, concentrée par chromatographie échangeuse d'anions puis purifiée par chromatographie d'exclusion (Maitrepierre *et al.* 2013).

Une autre méthode de production de TAS1R2-DNT de souris et d'homme a été mise au point par Assadi-Porter et collaborateurs, basée sur l'utilisation de la protéine de fusion SUMO (Assadi-Porter *et al.* 2018). La protéine recombinante SUMO-TAS1R2-DNT a été produite sous forme de corps d'inclusion en *E. coli*. Après solubilisation, la protéine a été repliée et purifiée en deux étapes : une chromatographie d'affinité IMAC, suivi du clivage de la protéine de fusion SUMO et enfin d'une gel filtration.

Récemment la structure cristalline des DNT du TAS1R2/TAS1R3 du poisson medaka a été résolue après production du récepteur en cellules d'insectes S2. La construction intégrait l'étiquette FLAG en C-terminale qui a permis dans un premier temps d'extraire le récepteur du milieu de culture par chromatographie d'affinité. Puis les glycosylations ont été hydrolysées en résidus N-acetylglucosamine unique par une enzyme EndoH étiquetée His, elle-même éliminée par chromatographie IMAC. La protéine a été ensuite mélangée avec un fragment Fab d'anticorps spécifiques pour favoriser sa solubilité et stabilité. Finalement une chromatographie d'exclusion de taille a permis de purifier le complexe antigène-anticorps pour les étapes suivantes de cristallogenèse (Nango *et al.* 2016, Nuemket *et al.* 2017).

En ce qui concerne les récepteurs à l'amer, la production en levure *S. cerevisiae* des 25 récepteurs TAS2R humains par Sugawara et collaborateurs a été réalisée par fusion avec la protéine GFP pour faciliter le suivi des rendements de production par mesure de la fluorescence. Le prépropetide ppαMF et le peptide signal STE2 ont été comparés pour leur capacité à augmenter les rendements de production. La purification a été limitée à une chromatographie d'exclusion de taille, donnant lieu à l'obtention d'un pic homogène pour le

récepteur TAS2R41 (Sugawara *et al.* 2009). Enfin, le récepteur hTAS2R4 a été produit en cellules HEK293 à l'aide du plasmide pCEPA-rho-TAS2R4-His_6 en vue d'une utilisation sur biocapteur. Il a été purifié à l'aide d'un kit d'extraction des protéines membranaires et semble pourtant avoir été utilisé avec succès tel quel sous forme d'extrait entier de membranes non purifiées (Wu *et al.* 2013).

IV.1.2.3. Caractérisations biophysiques des GPCR purifiés

Après avoir été purifiés jusqu'à homogénéité, les récepteurs membranaires sont analysés pour vérifier le repliement correct de leur structure. Parmi les méthodes utilisées, le dichroïsme circulaire (CD) est une technique spectroscopique qui permet d'apprécier l'état de repliement au niveau secondaire des protéines en solution en estimant leur contenu en structures secondaires (Greenfield 2006c, Kelly *et al.* 2005, Kelly and Price 2000). Cette méthode est basée sur la capacité des structures secondaires de la protéine en solution à absorber la lumière polarisée dans l'UV lointain. Ces structures secondaires optiquement actives sont les hélices α et dans une moindre mesure les feuillets β. En effet les structures secondaires sont hautement asymétriques et possèdent des spectres dichroïques caractéristiques. Ainsi, les RCPG possèdent un spectre «en hélice α» caractéristique avec un pic maximum à 193 nm et deux déflections à 208 et 222 nm. Cette technique permet également de mesurer les changements conformationnels dus à une dénaturation thermique mais aussi de visualiser les changements associés à la fixation de ligands (Greenfield 2006a, Greenfield 2006b, Nie *et al.* 2005).

D'autres méthodes permettent de caractériser le degré d'oligomérisation des protéines. La plus simple consiste souvent à déposer les échantillons dans un gel BN-Page (Blue Native-Page) pour visualiser le poids moléculaire des protéines par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaires connus (Fiala *et al.* 2011). Le couplage de l'analyse des bandes obtenues dans le gel à la spectrométrie de masse permettra d'obtenir un poids moléculaire très précis et d'identifier la protéine par analyses comparatives des fragments d'empreintes peptidiques dans les banques de données. La technique de SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography- Multi-Angle Light Scattering) est beaucoup plus précise pour évaluer l'état d'oligomérisation (Korepanova and Matayoshi 2012, Slotboom *et al.* 2008, Ye 2006). Elle consiste en une chromatographie d'exclusion de taille (SEC) couplée « en ligne » avec la mesure de la diffusion de la lumière laser (LS), de l'index de réfraction (RI) et de l'absorbance UV. Les échantillons de protéines sont séparés par chromatographie d'exclusion. La lumière diffusée par une protéine est directement proportionnelle au produit de sa masse moléculaire moyenne et de sa concentration. Cette méthode rapide permet de séparer les protéines en solution et de déterminer leur masse moléculaire, leur rayon hydrodynamique et leur état. La

technique SAXS (Small Angle X-ray Scattering) ou diffusion de rayons X aux petits angles permet d'analyser la structure et les dimensions des protéines à l'échelle nanométrique. Elle nécessite aussi d'accéder à une ligne de SAXS sur un synchrotron qui va produire l'énergie des rayons X pour l'analyse. Cette technique fournit des informations par exemple sur la taille, la forme de la protéine, son repliement et sa dénaturation, son comportement d'agrégation, sa stabilité et sa masse moléculaire (Mertens and Svergun 2010, Vestergaard 2016). C'est une méthode particulièrement adaptée à l'étude des régions flexibles des protéines qui servent de connecteurs entre les domaines protéiques repliés ou d'amarrage pour lier des partenaires (Kikhney and Svergun 2015). La technique SAXS permet également une reconstruction de la forme moléculaire basse résolution (50 Å à 10 Å) de la protéine et fournit ainsi des informations complémentaires aux données obtenues par la RMN, la centrifugation analytique ou la cristallographie aux rayons X.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des protéines permet d'étudier le repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace ainsi que l'interaction entre deux molécules (Goncalves *et al.* 2010). Elle consiste à observer les noyaux des protons seuls ou avec les noyaux carbones et/ou azotes. Pour cela les échantillons doivent être marqués ^{1}H, ^{15}N ou ^{13}C en incorporant des isotopes stables et de l'eau deutérée dans la molécule au cours du processus de production et d'expression de la protéine. Sur une protéine marquée ^{15}N, les expériences 2D HSQC ou HMQC (Heteronuclear Single /Multiple Quantum Correlation ») permettent d'observer les pics de corrélation dus au couplage scalaire entre l'hydrogène amide et l'azote de chaque résidu. L'attribution des déplacements chimiques consiste à établir la correspondance entre chaque noyau de la protéine pour lequel on peut observer un signal et la fréquence de ce signal. Après avoir déterminer un maximum de contraintes entre les noyaux on va pouvoir retrouver la séquence primaire, en déduire des éléments de structure secondaire et enfin par des contraintes géométriques à travers l'espace on en déduit des éléments de structure tertiaire. La structure tridimensionnelle est généralement déduite à l'aide de programme de modélisation moléculaire utilisant des algorithmes de dynamique moléculaire (Nominé and Kieffer 2012).

Depuis la publication en 2000 de la première structure cristallographique d'un RCPG de classe A, la rhodopsine, les structures cristallines des RCPG ont été déterminées pour les principales classes de RCPG humaines. Pourtant bien que les RCPG représentent environ 800 gènes, on dénombre à ce jour au total seulement 62 structures de RCPG uniques, dont seulement onze récepteurs à l'état natif (http://gpcrdb.org/structure/statistics). En effet, l'obtention de cristaux (étape de cristallogenèse) est limitée par les difficultés à produire des cristaux, qui en plus soient de qualité pour diffracter à haute résolution. La cristallisation est le processus qui permet l'organisation des protéines sous forme d'un cristal. Les atomes sont alors empilés de façon régulière et périodique dans les trois dimensions de l'espace. Les

difficultés liées à l'utilisation des détergents pour extraire les récepteurs de la membrane, l'emploi d'additifs pour stabiliser et préserver la structure tridimensionnelle et la nécessité d'obtenir des solutions concentrées en protéines pour réaliser les gouttes de cristallogenèse, sont responsables de ce faible nombre. La miniaturisation des techniques de gouttes nanométriques grâce à la microfluidique permet aujourd'hui de cribler à haut débit les conditions de cristallogenèse. Cela a permis de réduire les coûts en temps et surtout en quantité de protéine membranaire à produire. Cependant la réalisation de cristaux reste une méthode empirique, ce qui implique de tester un grand nombre de conditions différentes. Par ailleurs les structures obtenues sont figées et ne reflètent pas forcement la forme active biologique dans son environnement.

De nouvelles approches se sont donc développées ces dernières années comme la cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) qui a valu en 2017 le prix Nobel de chimie aux pionniers de cette technique en pleine révolution (Nogales 2018). La cryo-EM constitue aujourd'hui une méthode alternative pour obtenir des structures protéiques à haute résolution tout en évitant l'utilisation des cristaux (Fernandez-Leiro and Scheres 2016). Même si les niveaux de résolution sont plus élevés (2 à 10 Å) que ceux obtenus en radio cristallographie, la cryo-EM est en pleine expansion pour des structures jusque-là difficiles à réaliser. En effet, contrairement à la cristallographie aux rayons X, les protéines de différentes conformations peuvent être séparées plus facilement permettant ainsi un certain degré d'hétérogénéité des échantillons. La cryo-EM ne nécessite que des microgrammes de protéines c'est pourquoi elle est particulièrement adaptée aux protéines difficiles à exprimer ou pour déterminer des structures de macromolécules larges et flexibles (Thompson *et al.* 2016). Enfin les progrès technologiques liés aux développement des détecteurs à électrons directs, les améliorations des techniques de vitrification et la technologie des traitements d'images, ont permis d'appliquer cette méthode avec succès à des protéines de taille inférieure à 200 kDa et des protéines membranaires dont certains RCPG (Koehl *et al.* 2019, Nango *et al.* 2016, Thal *et al.* 2018, Thonghin *et al.* 2018, Vinothkumar 2015).

IV.1.2.4. Caractérisation fonctionnelle de l'activité des GPCR

L'ensemble des techniques de purification et de validation de structure ne permettent pas à elles seules de discriminer les récepteurs fonctionnels des récepteurs inactifs. Pour cela des mesures biochimiques doivent être mises en œuvre pour valider l'activité fonctionnelle de la protéine membranaire purifiée. Le choix de la méthode est dépendant de la protéine elle-même, par exemple, ce peut être une mesure d'activité enzymatique si la protéine est une

enzyme. Dans le cas des récepteurs gustatifs, les mesures biochimiques vont consister à mesurer l'interaction du récepteur purifié avec une molécule sapide.

Les travaux de Nie et collaborateurs ont été les premiers à produire les domaines N-terminaux TAS1R2 et TAS1R3 de souris. La fonctionnalité des sous-unités a été évaluée par spectroscopie de fluorescence (Nie *et al.* 2005). En effet, la fluorescence intrinsèque des protéines est une méthode sensible de mesure d'interactions protéine-ligand fondée sur la mesure de la fluorescence de certains résidus aromatiques (tryptophanes et tyrosines essentiellement) qui composent la protéine et qui possèdent la capacité d'absorber une radiation de longueur d'onde donnée et d'émettre une radiation de longueur d'onde plus élevée. De plus, la fluorescence des tryptophanes varie de manière importante selon leur environnement, en particulier en fonction de leur exposition au solvant et de la présence de résidus plus ou moins proches ou de leur interaction avec le ligand. Par conséquent, la liaison ou les changements de conformations dus à la fixation d'un composé sont fréquemment à l'origine d'une variation de l'intensité de fluorescence, qui peut permettre de mesurer l'affinité avec les ligands. Cette méthode a été utilisée avec succès pour mesurer les interactions de récepteur humain hTAS1R3-DNT en présence de sucralose (Maitrepierre *et al.* 2012) ou de hTAS1R2-DNT et de certaines formes mutées du récepteur hTAS1R2-DNT avec des édulcorants . La microtitration calorimétrique isotherme, connue sous le nom d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) est une méthode directe de liaison qui permet de déterminer les paramètres thermodynamiques des interactions et qui n'est pas gênée par les problèmes d'absorbance ou de fluorescence des composés testés. Elle a permis de mesurer une constante d'affinité (K_d) de 7 mM pour le sucralose en présence de hTAS1R3-DNT (Laffitte *et al.* in preparation). Assadi-Porter et collaborateurs ont utilisé le dichroïsme circulaire et la spectroscopie RMN par différence de transfert de saturation (Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy, STD-NMR) pour mesurer l'affinité de hTAS1R2-DNT avec le néotame (Assadi-Porter *et al.* 2018).

IV.2. Expression fonctionnelle des RCPG en cellules vivantes

Parallèlement au développement des méthodes de production et de purification des RCPG solubles, de nombreux programmes de recherche sont axés sur des combinaisons d'essais cellulaires qui offrent l'avantage de pouvoir examiner le fonctionnement des RCPG dans leur environnement moléculaire et cellulaire complexe. Au cours des 20 dernières années, des efforts considérables ont été consacrés à la mise au point d'essais de criblage des RCPG afin de trouver des composés interagissant avec les récepteurs, d'élucider les mécanismes de signalisation ou d'évaluer l'efficacité des molécules. La plupart des approches

ciblent des étapes particulières de la cascade de signalisation des RCPG, allant de la liaison du ligand aux récepteurs, aux analyses fonctionnelles à base de cellules, où les partenaires des mécanismes de signalisation et de régulation sont sélectionnés. En outre, la combinaison de cellules génétiquement modifiées exprimant une grande variété de RCPG et l'arrivée de nouveaux modes de traitements et de lectures automatisés ont donné naissance à des plates-formes de criblage à haut débit (HTS, *High-Throughput Screening*) ou HCS (*High Content Screening*) qui peuvent cribler et doser en parallèle des millions de composés. Comme ces technologies se sont fortement introduites dans les programmes de recherche pharmaceutiques, de nouvelles découvertes intéressantes concernant la signalisation par les RCPG ont été mises en évidence. Il est maintenant bien reconnu que les RCPG ne peuvent agir indépendamment de leurs protéines G, et que dans une cellule vivante, la signalisation d'un récepteur est le produit d'un réseau complexe de rétroactions positives et négatives provenant de récepteurs multiples et que certains ligands stabilisent différentes conformations du récepteur de telles sortes que des voies peuvent être privilégiées au détriment des autres. En conséquence, de nouvelles analyses de dépistage/screening, où les lignées cellulaires reconstituées sont remplacées par des systèmes cellulaires plus réalistes, tels que des modèles tissulaires ou animaux, et le développement de technologies constituées de biocapteurs pour des tests cellulaires "*in vivo*" non invasifs sont en cours de réalisation.

IV.2.1. Les lignées cellulaires

Les cellules de mammifères, telles que les cellules embryonnaires de rein humain 293 (HEK293) et les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) sont largement utilisées comme hôtes pour exprimer des protéines recombinantes afin d'étudier leurs propriétés structurelles, biophysiques (Andrell and Tate 2013, Chaudhary *et al.* 2011, Nettleship *et al.* 2008) et pharmacologiques (Baldi *et al.* 2007, Dalton and Barton 2014). Plus particulièrement, les cellules HEK293 constituent un système hétérologue intéressant pour l'expression de protéines membranaires, notamment parce qu'elles disposent de la machinerie de modifications post-traductionnelles nécessaires au repliement correct et / ou à l'activité biologique optimale de nombreuses protéines cibles (**Figure 34**). Elles présentent également une grande efficacité de transfection et une traduction fidèle des protéines (Jager *et al.* 2013, Thomas and Smart 2005, Wurm 2004) qui conduiront à des rendements en protéines plus élevés (Backliwal *et al.* 2008) par rapport à d'autres cellules de mammifère, comme par exemple les cellules CHO (Bollin *et al.* 2011).

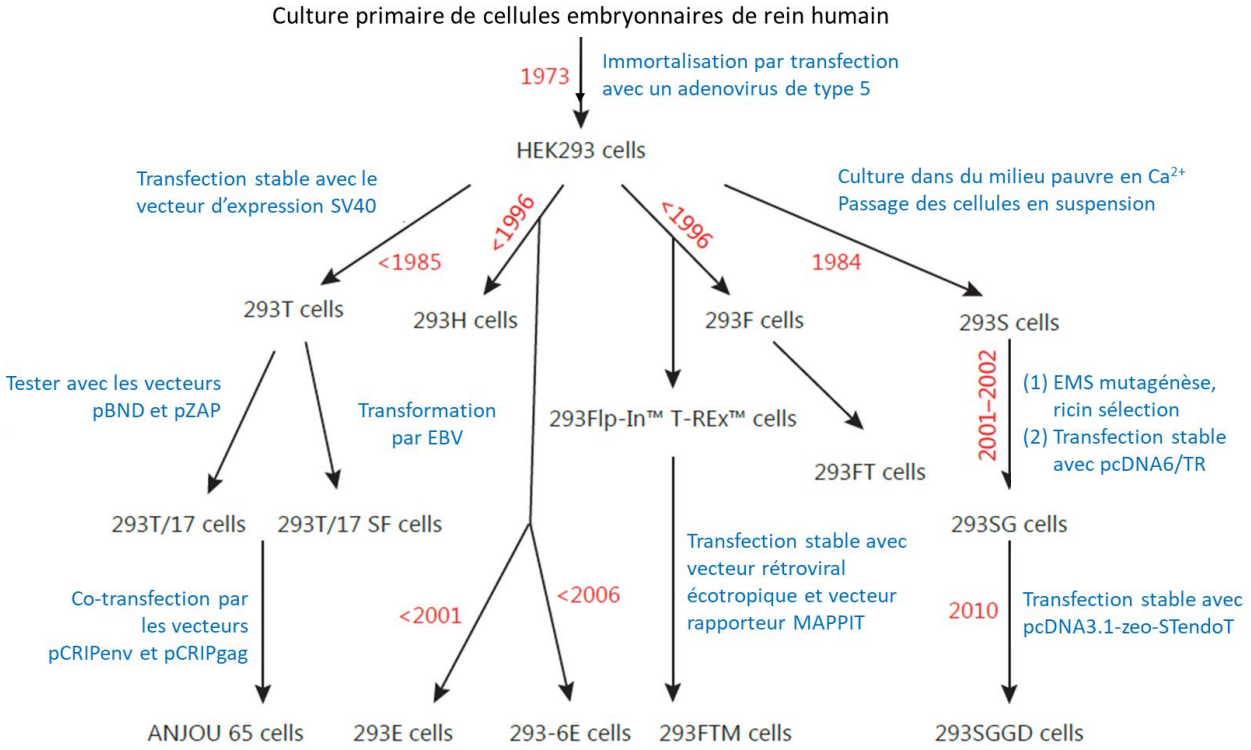

Figure 34 : Schéma des différentes lignées cellulaires HEK293 et de leur dérivation / historique. (d'après Hu, 2018).

Les cellules ont un phénotype de type fibroblaste ou épithéliale qui leur donne une forme pyramidale ou rhombique. Les cellules présentent des filopodes à leur surface. Elles se multiplient rapidement en environ 18 heures et elles ont tendance à continuer à se diviser même après avoir atteint la confluence, pour former des îlots. Le caryotype bien qu'hétérogène et instable a permis d'établir l'origine féminine de la lignée en référence à la présence de plusieurs chromosomes X et à l'absence de chromosome Y évalué en cytogénétique classique. Dans certains cas les noyaux cellulaires peuvent apparaitre gonflés et des hétérocaryons sont fréquents. Selon l'origine de la lignée, le nombre de passage, la façon de cultiver à long terme, il a été mis en évidence une grande variabilité du nombre moyen de chromosomes (entre 57 et 78 selon les sources) par cellules et d'aberrations chromosomiques au niveau du caryotype (Stepanenko and Dmitrenko 2015). Il existe un grand nombre de lignées dérivées de la souche originale qui ont été créées au cours de différents programmes de recherche et qui présentent des caractéristiques biochimiques spécifiques à certaines applications (Hu *et al.* 2018).

Les cellules HEK293 ont été immortalisées en 1973 après exposition d'une culture primaire de cellules embryonnaires de rein humain issues d'un embryon avorté à de l'ADN d'Adenovirus de type 5 (AD5) (Graham *et al.* 1977). Il aura fallu plus de 500 jours pour obtenir une croissance stable du clone 293. Il a été montré qu'un des sites d'intégration de l'ADN AD5 est localisé dans le gène *PSG4* (*pregnancy-specific beta-1-glycoportein 4*), localisé dans la région 19q13.2 du chromosome 19. Une étude récente a montré que la lignée HEK293 et ses dérivées (par exemple, 293T ou 293S) hébergent 5 à 6 copies de fragments d'ADN AD5 comme rapportée pour la lignée originale (Lin *et al.* 2014). De façon surprenante, il a été montré que la transformation des cellules par AD5 confère aux cellules HEK293 des propriétés associées aux lignées neuronales. Cela a été révélé par marquages immunocytochimiques qui ont montré la présence de quatre sous-unités de neurofilaments normalement exprimées exclusivement dans les neurones (Shaw *et al.* 2002). La transformation par l'AD5 aurait activé des gènes qui étaient quiescents depuis la différentiation des cellules en cellules rénales. Ainsi cette lignée de cellules rénales pourrait avoir plus de points communs avec les neurones que ce qui avait été envisagé initialement.

Les cellules HEK possèdent un certain nombre de récepteurs endogènes comme par exemple des canaux ioniques voltages dépendants mais aussi des RCPG et des protéines régulatrices d'origine neuronale. Un grand nombre a été identifié par des tests électrophysiologiques ou biochimiques ou par des méthodes de RT-PCR (Shaw *et al.* 2002, Thomas and Smart 2005). Parmi ces RCPG on pourra citer la présence d'ARNm des RCPG mGLuR4, GABBABR1a, 5-HT7b impliquant les voies de signalisation couplées aux protéines G et montrant que la voie du DAG, de l'IP3 et du calcium est opérationnelle. On notera aussi la présence des ARNm pour les récepteurs à l'acétylcholine, pour la sous-unité du récepteur du glutamate mGluR3 et pour les récepteurs purinergiques P2Y capables de mobiliser le calcium intracellulaire après activation par l'ATP (He *et al.* 2003).

IV.2.2. Les protéines G et les facteurs accessoires

Il a clairement été établi que la voie de transduction du signal des RCPG repose sur la présence de trois composants : le récepteur membranaire, la protéine G hétérotrimérique et un système effecteur tel que l'enzyme de libération du second messager. La protéine G varie entre deux états, l'un actif (GTP lié) l'autre inactif (GDP lié). La fixation du ligand au récepteur induit un changement de conformation qui en retour active la protéine G, entraînant un échange entre le GDP et le GTP. La forme active de la protéine G se dissocie en ses deux sous-unités α et β/γ qui va interagir avec par exemple l'adenylate cyclase (AC) ou la phospholipase C déclenchant la libération d'un second messager et des réactions en cascades de réactions qui aboutiront à une réponse biologique (Kostenis *et al.* 2005, Smrcka

2008). Il existe 16 gènes qui codent différentes sous-unités α, cinq pour la sous-unité β et 14 pour la sous-unité γ.

Les cellules gustatives expriment différentes protéines G (Gαi-2, Gαi-3, Gα14, Gα15, Gαq, Gαs, et α-transducine), et il a été démontré que la sous-unité α de la gustducine (Gαgust) est la protéine G privilégiée pour la transduction des signaux au niveau des récepteurs gustatifs (Margolskee 2002, Montmayeur and Matsunami 2002, Wong *et al.* 1996). Plus particulièrement, les 44 acides aminés situés en position C-terminale sont déterminants pour le couplage intracellulaire (Ueda *et al.* 2005). L'expression de différentes chimères de protéines G a permis aussi de révéler que la protéine Gαi2 pourrait aussi jouer un rôle dans la perception du goût amer (Ueda *et al.* 2005).

De manière générale, les protéines G sont classées en quatre catégories selon leur fonction dans la cascade de transduction : les Gs stimulent la libération d'AMPc, les Gi à l'inverse inhibent la libération d'AMPc, les Gq augmentent le calcium intracellulaire, et les Go qui regroupent toutes les autres protéines G (Milligan 2007). La désensibilisation des récepteurs lors de la liaison du ligand entraîne la fin du cycle de signalisation et représente une étape importante dans la dynamique de la régulation des GPCR. Ce processus implique des familles de protéines qui catalysent la phosphorylation du récepteur, induites par la liaison de l'agoniste. Cependant, certaines kinases, telles que la protéine kinase A ou C, peuvent phosphoryler le récepteur et donc le désensibiliser indépendamment de la liaison au ligand. Le processus de phosphorylation détermine le recrutement de β-arrestines qui jouent un rôle clé dans la terminaison du signal en perturbant la liaison entre le récepteur et la protéine G. De plus, les arrestines sont impliquées dans l'internalisation du récepteur. Une fois internalisé, les GPCR sont soit dégradés par endocytose, soit recyclés vers la membrane.

Il a été démontré que certaines protéines qualifiées de « protéines accessoires aident au fonctionnement de certaines RCPG (Cooray *et al.* 2009). Bien que le mécanisme d'action par lequel elles assistent l'expression fonctionnelle du récepteur ne soit pas connu, différentes catégories ont été observées. Certaines jouent un rôle similaire aux protéines chaperonnes en aidant au repliement correct de la protéine au cours de sa synthèse. D'autres interviennent en facilitant l'adressage du RCPG du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire. Certaines font partie intégrante d'un complexe lié au GPCR aidant à sa rétention dans la membrane durant la fixation du ligand ou à son changement de conformation pendant l'interaction (Cooray *et al.* 2009). Au niveau des récepteurs sensoriels, les protéines RTP1 et RTP2 (Receptor Transporting Protein) et REEP1 (Receptor Expression Enhancing Protein) ont été identifiées au niveau des neurones olfactifs (Mainland and Matsunami 2012, Saito *et al.* 2004). Une autre étude a montré que les protéines RTP3, RTP4 et REEP1 pouvaient

influencer le trafic cellulaire du récepteur à l'amer TAS2R16 (Behrens *et al.* 2006). La protéine accessoire REEP2 est une protéine membranaire qui est exprimée dans les cellules gustatives. Des techniques immunologiques de co-marquage, de co-précipitation et de western blot ont démontré que REEP2 était physiquement associée aux sous-unités TAS1R2 ou TAS1R3 (Ilegems *et al.* 2010). Contrairement à RTP1, RTP2 et REEP1 qui améliorent la fonction des récepteurs olfactifs en favorisant leur transit à la surface cellulaire, REEP2 n'augmente pas l'expression des récepteurs TAS1Rs mais modifie leur organisation spatiale. REEP2 recrute les récepteurs sucrés dans les microdomaines appelés « radeaux lipidiques » (Raft) situés près de la région apicale de la cellule gustative, améliorant ainsi la signalisation des RCPG et favorisant l'accès des récepteurs aux molécules sapides arrivant par le pore gustatif apical (Ilegems *et al.* 2010).

IV.2.3. Mobilisation du calcium intracellulaire

Les technologies HTS sont devenues un élément fondamental de l'étude de la fonctionnalité des RCPG en permettant de tester *in vitro* une multitude de ligands ou de mutations des récepteurs (Greasley and Jansen 2005, Thomsen *et al.* 2005, Zhang and Xie 2012). Le principal avantage de l'utilisation d'essais sur cellules vivantes pour le criblage des ligands des RCPG est lié à son pouvoir prédictif plus élevé pour la pharmacologie *in vivo*. Les tests sur cellules vivantes peuvent être basés sur la surveillance de (i) l'activité de la protéine G, (ii) la libération de seconds messagers (par exemple, AMPc, IP3, calcium), (iii) la redistribution des protéines (internalisation par le RCPG ou le recrutement de β-arrestine) et (iv) l'expression de gènes rapporteurs (par exemple, la luciférase) sous la régulation des éléments génétiques de la réponse du second messager (par exemple cAMP response element (CRE), nuclear factor of activated T-cells response element (NFAT-RE)).

La principale voie de signalisation cellulaire mise en jeu lors de l'activation des récepteurs gustatifs est la voie calcique. La fixation du ligand au récepteur membranaire va activer la protéine G (Gαgust) qui va interagir avec la phospholipase C qui catalyse la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol-1,4,5-triposphate (IP3). L'IP3 se lie au récepteur IP3R3 du réticulum endoplasmique qui va libérer du calcium intracellulaire dans le cytoplasme. Dans la pratique, les essais biochimiques permettant de mesurer la mobilisation du calcium intracellulaire sur cellules vivantes consistent à ensemencer les cellules dans des plaques de microtitration (96, 384, 1536 puits). Les cellules peuvent exprimer le RCPG d'intérêt de façon stable ou être transfectées de façon transitoire pour l'exprimer. Après attachement au support et expression du RCPG à la membrane, les cellules sont incubées avec les composés à tester durant un laps de temps dépendant du test (Zhang and Xie 2012). Ensuite l'activité mesurée est enregistrée en couplant le dosage de la cible à un système rapporteur de lecture optique,

généralement basé sur de la fluorescence ou de la luminescence (An and Tolliday 2010, Greasley and Jansen 2005, Hansen and Brauner-Osborne 2009). Dans l'idéal, la mesure réalisée des flux calciques doit être simple, non radioactive, robuste (rapport signal/ bruit élevé), homogène (pas de lavage des cellules) contenir un minimum de réactifs et adaptable à différents formats de microplaque pour faciliter la lecture et l'automatisation en robotique. De même, la mesure des évènements au plus proche de l'activation du récepteur réduira l'incidence des faux positifs, même si les rapports signal/bruit peuvent être améliorés et amplifiés en descendant la cascade de transduction du signal. Ainsi depuis le milieu des années 2000, un certain nombre de sociétés commerciales de biotechnologie (Molecular Probes, Molecular Devices, Perkin Elmer, DiscoverX, CisBio) ont mis au point des tests permettant de cribler les interactions ligands - RCPG sur cellules vivantes de façon automatisée, souvent miniaturisée, avec des délais d'exécution rapide (Martins *et al.* 2012, Thomsen *et al.* 2005, Zhang and Xie 2012).

L'intégration de la protéine G adéquate pour le couplage du signal intracellulaire à la voie calcique est un prérequis indispensable au succès de la mesure. Parmi les diverses protéines chimères utilisées à ce jour, Gα15 et Gα16 sont les plus favorables en termes d'interactions avec les RCPG. La protéineGα16 humaine (ainsi que la Gα15 murine) se couple à un grand nombre de RCPG qui sont normalement liés à Gαi ou à Gαs et a été désignée comme « adaptateur universel » pour les RCPG (Lee *et al.* 1998, Liu *et al.* 2003, Milligan *et al.* 1996, Offermanns and Simon 1995). Les tests cellulaires mesurant l'activité des récepteurs gustatifs mettent en jeu dans la quasi-totalité des expérimentations des lignées de cellules HEK293 transfectées de façon stable avec la protéine Gα16-gust44 qui est une chimère de la protéine Gα16 où les 44 acides aminés C-terminaux de la gustducine on été substitués à ceux de la Gα16 afin d'améliorer le couplage avec les récepteurs gustatifs (voir l'ensemble des travaux de l'équipe de Meyerhof W (Dife Institut, Allemagne), Slack JP (Givaudan), Guy Servant (Senomyx)). Parallèlement les constructions plasmidiques des gènes codant pour les récepteurs membranaires contiennent généralement de petites séquences signal, dite signal peptide, qui ont pour objectif d'améliorer l'adressage du RCPG à la membrane. Dans la plupart des travaux publiés sur cellules vivantes exprimant des récepteurs du goût, on trouve en position N-terminale, la rhodopsine (Rho) ou la somatostatine 3 (SST3) qui favorise l'expression membranaire des récepteurs gustatifs (Ammon *et al.* 2002).

Parmi les différents tests fonctionnels existants pour mesurer le calcium intracellulaire, l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au calcium est la méthodologie la plus fréquemment utilisée (Chambers *et al.* 2003). En effet, de nombreuses sondes ont été développées pour améliorer la gamme dynamique de sondes et l'intensité du signal de fluorescence (Fluo-3, Fluo-4, Fura-2) ou pour développer des kits homogènes qui permettent

le chargement cellulaire du colorant sans nécessité de lavage ultérieur des cellules (Fluo-8NW No Wash, Calcium-6). Une variante de cette mesure du calcium, utilise une photo-protéine de méduse (*Aequorea victoria*) exprimée de façon recombinante (Eglen and Reisine 2008). L'aequorine est une protéine rapporteuse, sensible au calcium qui génère un signal luminescent lorsqu'un dérivé de coelenterazine est ajouté (Dupriez *et al.* 2002, Inouye *et al.* 1985, Le Poul *et al.* 2002, Prasher *et al.* 1985). La société Perkin Elmer a développé des vecteurs d'expression et des lignées cellulaires modifiées appelées AequoScreen™ dans lesquelles différents RCPG ou protéines G sont associées à une version ciblée de l'apoaequorine ciblant les mitochondries. Parallèlement de nombreux laboratoires de recherche ont cherché à intégrer les photo-protéines comme outils de mesure pour l'activité des RCPG. Toda et collaborateurs ont proposé en 2011 un modèle cellulaire basé sur la transfection transitoire de la clytine II (une photoprotéine de la méduse *Clytia gregaria*) (Inouye 2008) au niveau mitochondrial pour l'évaluation de l'activité fonctionnelle du récepteur au goût sucré TAS1R2/TAS1R3 (Toda *et al.* 2011) et au goût umami TAS1R1/TAS1R3 (Toda *et al.* 2013).

Certains tests de criblage qui s'appuient sur les voies de signalisation liées aux PLC, via Gαq ou Gα15/16 mesurent l'accumulation d'IP3. Historiquement la détection radioactive des inositolphosphates (IP) a été remplacée par des techniques non isotopiques telles que la détection par fluorescence de la libération transitoire du calcium intracellulaire ou par des dosages de gènes rapporteurs luminescents. Depuis sa publication en 2005, la société CisBio a revisité la mesure des IP en mettant au point son test IP-One™. Cette technologie est basée sur la détection de l'accumulation intracellulaire d'un métabolite de l'IP3, le monophosphate de D-myoinositol (IP1), et la technologie homogène de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, appelée encore transfert d'énergie par résonance de type Föster ou HTRF (Homogenous Time Resolved Fluorescence) (Trinquet *et al.* 2011). En pratique, quelle que soit la famille de récepteurs, l'activation déclenche la libération d'IP3, ce qui entraîne une augmentation transitoire de Ca^{2+} intracellulaire. La durée de vie de l'IP3 dans la cellule est très courte (moins de 30 secondes) avant de se transformer en IP2 et IP1. Lorsque du chlorure de lithium (LiCl) est ajouté au milieu de culture, la dégradation de IP1 en myo-inositol est inhibée et l'IP1 peut donc s'accumuler dans la cellule. Le test repose sur un principe de dosage immunologique compétitif selon lequel l'IP1 libre est en concurrence avec de l'IP1-europium (accepteur HTRF®) pour la liaison au conjugué anti-IP1 Cryptate (donneur HTRF®). Le signal est inversement proportionnel aux niveaux d'IP1 dans la cellule avec un FRET maximum obtenu en l'absence d'IP1. Contrairement aux tests calciques par sondes fluorescentes dans lesquels l'agoniste agit sur le récepteur pour induire la réponse dans un délai court, le test IP-One détecte l'accumulation d'un analyte à l'équilibre. Ainsi il offre une alternative intéressante car contrairement aux essais calciques classiques, il permet d'identifier des composés qui

agissent lentement sur les récepteurs ou qui sont des antagonistes ou agonistes inverses (Bdioui *et al.* 2018). A ce jour, à ma connaissance, aucune étude n'a cependant été publiée sur les récepteurs gustatifs et cette méthodologie.

Partie 2 :

Méthodologies,

résultats, discussions

I. Article 2 :

Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli.

Belloir C, Savistchenko J, Neiers F, Taylor AJ, McGrane S, Briand L

PLoS One. 2017, 30;12(10):e0187051. doi: 10.1371/journal.pone.0187051

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in *Escherichia coli*

Christine Belloir[1☯], Jimmy Savistchenko[1☯], Fabrice Neiers[1], Andrew J. Taylor[2], Scott McGrane[2], Loïc Briand[1]*

1 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Bourgogne Franche-Comté University, AgroSup Dijon, Dijon, France, **2** WALTHAM Centre for Pet Nutrition, Melton Mowbray, Leicestershire, Great Britain

☯ These authors contributed equally to this work.
* loic.briand@inra.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Belloir C, Savistchenko J, Neiers F, Taylor AJ, McGrane S, Briand L (2017) Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in *Escherichia coli*. PLoS ONE 12(10): e0187051. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051

Editor: Keiko Abe, The University of Tokyo, JAPAN

Received: July 12, 2017

Accepted: October 12, 2017

Published: October 30, 2017

Copyright: © 2017 Belloir et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant from the WALTHAM Centre for Pet Nutrition, which is part of Mars Petcare UK, to LB. There was no additional internal or external funding received for this study. WALTHAM Centre for Pet Nutrition provided support in the form of salaries for authors Andrew J. Taylor and Scott McGrane but did not have any additional role in the study design, data

Abstract

Umami taste perception is mediated by the heterodimeric G-protein coupled receptors (GPCRs), formed by the assembly of T1R1 and T1R3 subunits. T1R1 and T1R3 subunits are class C GPCRs whose members share common structural homologies including a long N-terminal domain (NTD) linked to a seven transmembrane domain by a short cysteine-rich region. The NTD of the T1R1 subunit contains the primary binding site for umami stimuli, such as L-glutamate (L-Glu) for humans. Inosine-5'-monophosphate (IMP) binds at a location close to the opening of the T1R1-NTD "flytrap", thus creating the observed synergistic response between L-Glu and IMP. T1R1/T1R3 binding studies have revealed species-dependent differences. While human T1R1/T1R3 is activated specifically by L-Glu, the T1R1/T1R3 in other species is a broadly tuned receptor, sensitive to a range of L-amino acids. Because domestic cats are obligate carnivores, they display strong preferences for some specific amino acids. To better understand the structural basis of umami stimuli recognition by non-human taste receptors, we measured the binding of selected amino acids to cat T1R1/T1R3 (cT1R1/cT1R3) umami taste receptor. For this purpose, we expressed cT1R1-NTD in bacteria as inclusion bodies. After purification, refolding of the protein was achieved. Circular dichroism spectroscopic studies revealed that cT1R1-NTD was well renatured with evidence of secondary structures. Using size-exclusion chromatography coupled to light scattering, we found that the cT1R1-NTD behaves as a monomer. Ligand binding quantified by intrinsic tryptophan fluorescence showed that cT1R1-NTD is capable of binding L-amino acids with K_d values in the micromolar range. We demonstrated that IMP potentiates L-amino acid binding onto renatured cT1R1-NTD. Interestingly, our results revealed that IMP binds the extracellular domain in the absence of L-amino acids. Thus, this study demonstrates that the feasibility to produce milligram quantities of cT1R1-NTD for functional and structural studies.

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing interests: This work was supported by a grant from the WALTHAM Centre for Pet Nutrition, which is part of Mars Petcare UK, to LB. AJT and SM were paid employees of Mars Petcare UK during the period the work was conducted, based at the WALTHAM Centre for Pet Nutrition. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Umami is one of the five basic taste qualities whose proposed physiological role is to signal the presence of proteins in food by detecting free L-amino acids. In humans, this typical taste is elicited mainly by L-glutamic acid (L-Glu), which is found naturally in many protein-rich foods such as meat, poultry, fish and seafood. Comparative behavioural studies have demonstrated widely divergent taste preference to L-amino acids across animal species, such as mice [1], rats [2], rhesus monkey [3] and domestic pigs [4–6]. For instance, only two amino acids, L-Glu and, to a lesser extent, L-aspartic acid (L-Asp) are umami stimuli for humans [7]. In contrast, behavioural and electrophysiological experiments have revealed that rodents are able to perceive a larger range of L-amino acids [8]. A unique feature of umami taste is its potentiation by purine nucleotides such as inosine-5'-monophosphate (IMP) and guanosine-5'-monophosphate (GMP), which also elicit some umami taste on their own [9].

The umami taste receptor is a heterodimeric receptor composed of the T1R1 and T1R3 subunits, whereas T1R2 and T1R3 subunits assemble to form the sweet taste receptor [7, 10]. T1R1, T1R2 and T1R3 subunits belong to the family of class C, G protein-coupled receptors (GPCRs). All the members of this family share a similar architecture constituted by a large N-terminal domain (NTD) linked to the characteristic heptahelical transmembrane domain (HD) by a cysteine-rich region (CRR). It has been shown that the NTD of T1R1 (T1R1-NTD), also described in the literature as the Venus flytrap domain, which has sequence homology to bacterial periplasmic amino acid binding proteins, contains the orthosteric binding site for umami molecules [11, 12]. Structural analysis of the homodimeric rat mGluR1-NTD revealed that the extracellular ligand-binding domain is made by two lobes separated by a cleft in which L-Glu binds. The crystal structure solved in the absence and presence of L-Glu demonstrated that mGluR1-NTD exists in dynamic equilibrium between an open and closed conformation, which is stabilized by the bound L-Glu [13]. Recently, Nuemket et al. [14] deciphered the X-ray structure of medaka fish T1R2-NTD/T1R3-NTD heterodimer bound to different amino acids, preferable taste substances to these fish. The authors characterized the binding sites of the receptor and found a compact heterodimer arrangement in the presence of amino acid ligands.

Cellular assays combined with site-directed mutagenesis have revealed the molecular mechanism of synergy between L-Glu and 5'ribonucleotides. Thus, it has been demonstrated that L-Glu binds in the hinge region of the T1R1-NTD inducing its closure whereas IMP binds to an adjacent site, close to the opening, further stabilising the closed conformation of the T1R1-NTD [12]. More recently, the key residues responsible for the species difference between human and mouse T1R1/T1R3 binding selectivity have been identified [15]. Using human-mouse chimera, site-directed mutagenesis and molecular modelling, the authors demonstrated a complex mechanism of L-amino acid recognition involving both the orthosteric and non-orthosteric site of T1R1. There are multiple lines of evidence arguing for the presence of additional umami receptors in mice [16–19], including truncated forms of metabotropic glutamate receptors types 1 (mGluR1) and 4 (mGluR4) [20, 21]. However, taste-mGluRs are activated by some L-amino acids and analogs, but are not reported to be sensitive to ribonucleotides (i.e. acting as agonists or positive modulators).

The domestic cat (*Felis catus*) is an obligate carnivore and naturally eats a high protein, low carbohydrate diet. Cats respond positively to salty molecules and are known to avoid stimuli that taste sour or bitter for humans. Recently, the functional analysis of feline bitter taste receptors using cellular based assays has been reported [22, 23]. Physiological and behavioural studies have demonstrated that domestic cats are sensitive to various L-amino acids [24–27]. Molecular modelling of cat T1R1 and *in vivo* tests have revealed that, contrary to the human

umami receptor where the acidic amino acids (L-Glu and L-Asp) are the key ligands, the cat receptor has a broadly tuned binding specificity towards various amino acids of different classes, including L-histidine (L-His) and L-alanine (L-Ala) [26]. In addition, this study revealed that synergism between 5'-monophosphate ribonucleotides, such as IMP and L-amino acids exists in cats [26, 28], as previously demonstrated in human and mouse umami receptors [9, 29]. Surprisingly, it has been shown that cats display indifference toward sugars or artificial sweeteners, whereas the other taste modalities in the cat are functional. The open reading frame of the gene coding the T1R2 subunit is a pseudogene (non functional and non-expressed gene) and accounts for insensitivity of cats toward sugars [30]. In contrast, Giant pandas lost the T1R1 gene, which is non-functional, in accordance with their herbivore diet comprised almost exclusively of bamboo [31, 32]. Intriguingly, a recent study revealed an alternative T1R2-independent mechanism for carbohydrate detection in hummingbirds. The authors proposed that the ancestral hummingbird umami T1R1/T1R3 receptor evolved to function as a sugar receptor allowing these birds to perceive sweet nectar [33]. In cats, the T1R1 gene is functional [30] and it was reported that T1R1 assembles with T1R3 forming the heterodimer T1R1/T1R3, which is sensitive to some L-amino acids [26]. In addition, human and rodent T1R3, unlike T1R1, seems to have the ability to form T1R3/T1R3 homodimer sensitive to sugars, but only at high concentrations [10, 34]. In cats, the function of the homodimer of cT1R3 receptor remains unknown.

Ligand binding studies of the isolated mouse and human T1R2- and T1R3-NTDs expressed in *Escherichia coli* have shown that T1R-NTDs are able to bind natural sugars (sucrose and glucose) and the chlorodeoxysugar sucralose with distinct and physiological relevant affinities [35–37]. To further understand the structural basis of L-amino acid recognition by the umami taste receptor and the molecular mechanism of IMP synergy in ligand binding, we report here the expression of the N-terminal domain of the cat T1R1 taste receptor (cT1R1-NTD) in *Escherichia coli* as aggregated inactive proteins called inclusion bodies. The expression of target proteins using this approach has several advantages including the very high yield of produced protein, the easy isolation of the inclusion bodies with a high degree of purity and the protection of the expressed protein from proteolysis. Pure cT1R1-NTD inclusion bodies were solubilised and refolded *in vitro*. Circular dichroism (CD) spectroscopic studies revealed that cT1R1-NTD was properly refolded with evidence of secondary structures. Using size-exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering (SEC-MALS), we found that the cT1R1-NTD behaved as a monomer. Using intrinsic tryptophan fluorescence, we demonstrated that cT1R1-NTD was able to bind six selected L-amino acids with distinct and physiological relevant affinity. In addition, we demonstrated the positive effect of IMP on L-amino acid binding, further demonstrating that refolded cT1R1-NTD is functional. Importantly, we observed that IMP is able to bind to the extracellular domain in the absence of L-amino acid. This study offers interesting new experimental strategies to screen new tastants or to provide new insights into molecular determinants of umami perception including NMR spectroscopic analyses or crystallization trials.

Materials and methods

Construction of the expression plasmid

The cDNA sequence encoding cT1R1-NTD minus a putative signal sequence and the cysteine-rich region (CRR) was optimized for expression in *E. coli* and synthesized by GeneArt® Gene Synthesis (Life Technologies). The synthetic cDNA of cT1R1-NTD was subcloned into the *Nde*I and *Eco*RI restriction sites of pET28a (Novagen) expression vector as described for human T1R1-NTD [38]. The resulting expression vector pET28-cT1R1-NTD encodes a fusion

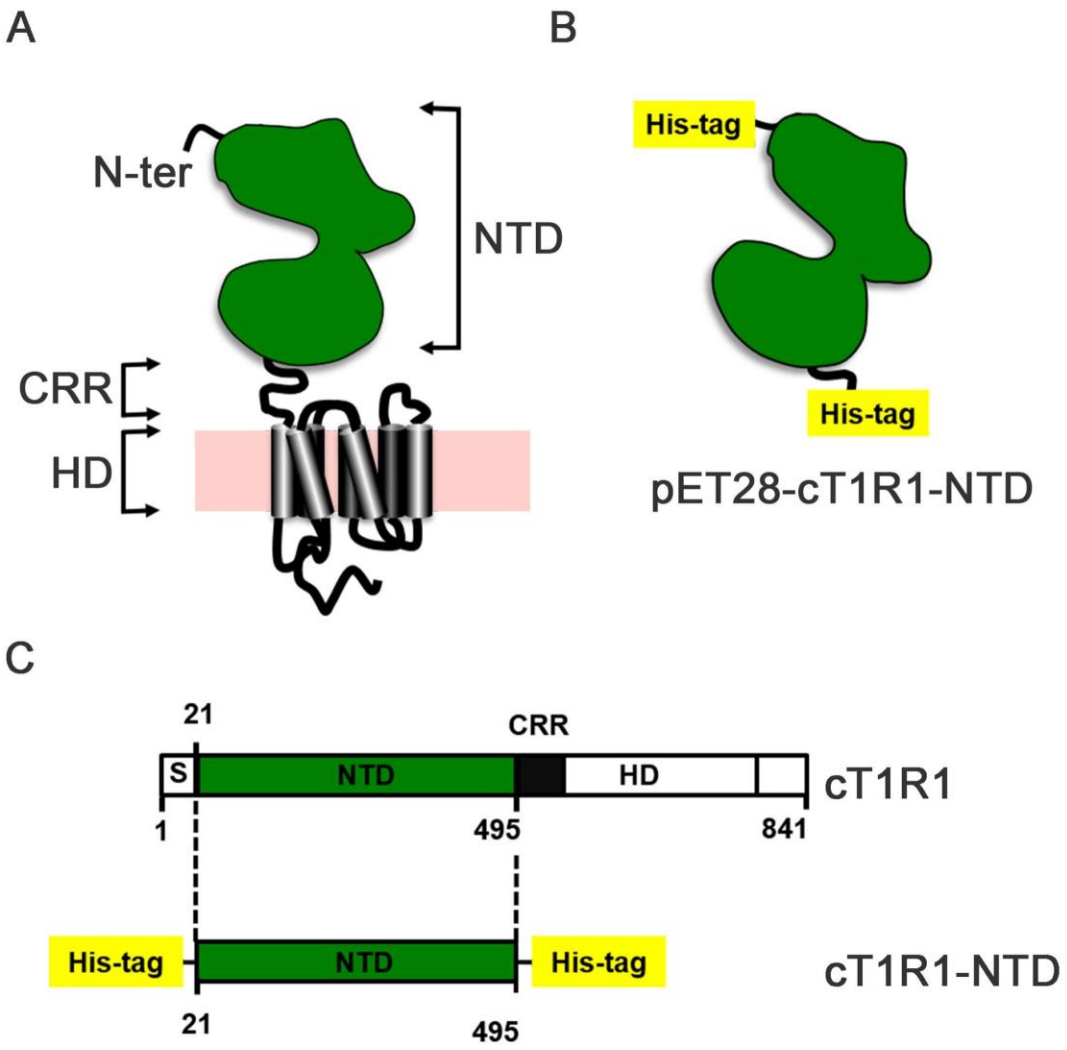

Fig 1. Strategy used for expression of the cat T1R1-NTD in bacteria. (A) The N-terminal domain (NTD) of cT1R1 was expressed independently from the transmembrane heptahelical domain (HD), minus a short putative signal peptide (S), and a cysteine-rich region (CRR). (B) The pET28-cT1R1-NTD plasmid encodes a fusion protein that contains an N-terminal His-tag that can be cleaved with thrombin, followed by cT1R1-NTD (Leu21-Ser495) and a C-terminal His-tag. (C) Full-length cT1R1 is presented according to its primary amino acid sequence deduced from DNA sequence. The numerical positions of amino acid residues of cT1R1 are indicated.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g001

protein comprising a N-terminal $(His)_6$-tag, followed by the NTD and a C-terminus $(His)_6$-tag (Fig 1 and S1 Fig).

Recombinant protein expression and inclusion bodies preparation

For production of cT1R1-NTD, *E. coli* BL21 (DE3) cells (Stratagene) containing pET28-cT1R1-NTD plasmid were grown in 2xYT medium (16 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, pH 7.5) supplemented with kanamycin (45 μg/ml) at 37˚C and induced to an optical

density of 0.8 at 600 nm. Protein overexpression was induced for 3 h at 20˚C by adding 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG). Cells were harvested by centrifugation (4500 x *g* for 15 min at 4˚C) and stored at -20˚C until use. Inclusion bodies of cT1R1-NTD were purified as previously described [35]. Briefly, cells from 2 litres of culture were re-suspended in 50 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF, DNase I, 3 mM desoxycholic acid), and disrupted by sonication. After centrifugation (10,000 x *g* for 15 min, 4˚C), the pellet containing inclusion bodies was thoroughly re-suspended in 100 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100 and disrupted by sonication, followed by a second centrifugation. Inclusion bodies were washed twice using 200 ml of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 4 M urea. The inclusion bodies were then washed with 100 ml of water and dissolved in 40 ml of solubilizing buffer (50 mM Na_2HPO_4 pH 8.0, 0.5 M NaCl, 6 M guanidine hydrochloride, 25 mM dithiothreitol (DTT)) and stirred for 12 h at room temperature. Protein purity and integrity were verified by SDS-PAGE. Protein solutions were clarified by filtration using 0.45 μm filters followed by centrifugation (10,000 x *g* for 45 min, 10˚C), concentrated to 20 mg/ml using Amicon concentrator (12–14 kDa molecular mass cut-off) and stored at -20˚C. Protein concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm with a molar extinction coefficient of 77,975 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

In vitro refolding of cT1R1-NTD

cT1R1-NTD was refolded by dialysis using the protocol developed for hT1R3-NTD [35] with slight modifications (S2 Fig). Twenty milligrams of pure inclusion bodies were diluted into 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 12.5 mM DTT, 20 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1mM n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) to obtain a final protein concentration of 50 μg/ml and incubated at 50˚C in a water-bath for 1 h. Protein solution was then successively dialysed (12–14 kDa molecular mass cut-off) for 16 h against 3.2 l of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M urea, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM SDS, 0.1 mM DDM then for 2 h against 3.2 l of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 2 mM SDS, 0.1 mM DDM at room temperature. After filtration through 0.45 μm pore size filter and concentration to a final protein concentration of 0.5–1 mg/ml using a Vivaspin concentrator (50 kDa molecular mass cut-off), cT1R1-NTD refolding was initiated by precipitating dodecyl sulfate as its potassium salt, adding KCl in the presence of DDM (5 mM final concentration) and 300 mM NaCl. Under vigorous stirring, KCl (2 M) was added to the protein solution in order to bring the nominal concentration of free K^+ ions to 300 mM. After 30 min, the SDS precipitate was removed by centrifugation at 48,400 x *g* for 1 h at 15˚C. To remove residual dodecyl sulfate, the supernatant was extensively dialysed (50 kDa molecular mass cut-off) against 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM DDM (~total dialysis time: 16 h) at room temperature. Refolded cT1R1-NTD was concentrated 10 fold (2-5mg/ml) using a Vivaspin concentrator (50 kDa molecular mass cut-off). After filtration through 0.22 μm pore size filter to remove possible aggregates, cT1R1-NTD was purified using size exclusion chromatography (SEC). SEC was performed through a gel filtration chromatography column (Superdex200 high performance, 10 mm i.d. x 300 mm; GE Healthcare) connected to a FPLC ÄKTA pure system (GE Healthcare). The column was equilibrated at 0.5 ml/min with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM DDM. Two or three injections of 0.5 ml of cT1R1-NTD were performed. The purity of the sample was assessed by SDS-PAGE [39], using Coomassie staining.

To detect cT1R1-NTD, protein samples were separated by SDS-PAGE, transferred, and immunoblotted with mouse anti-his-tag primary antibody (diluted 1:2,000, Bio-Rad) followed by goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (diluted 1:50,000,

Bio-Rad). Immunoblots were detected using ECL chemiluminescent kit (Clarity Western ECL Substrat, Bio-Rad) and ChemiDoc apparatus (Bio-Rad). Eluted protein peak fractions that corresponded to monomeric protein were collected and pooled. The protein concentration was determined by measuring absorbance at 280 nm.

Protein identification

Purified protein band sequences were identified by peptide mass fingerprinting involving tryptic cleavage, combined with MALDI-ToF analysis. Protein identification was carried out at the PAPPSO platform (INRA, Jouy-en-Josas, France) using MS-Fit (Protein Prospector, UCSF) program.

Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle laser Light Scattering (SEC-MALS) analysis of the refolded protein

Protein oligomeric state was studied using a Jasco PU-2080 Plus system consisting of a pump, a vacuum degasser, an autosampler, and a Silica Gel KW804 column (Shodex). Detection was performed using a triple-angle light scattering detector (Mini- DAWN™ TREOS, Wyatt Technology), a Shimadzu refractometer (RID-10A) and a SpectraSeries UV100 detector. Molecular weight determination was performed using the ASTRA VI software (Wyatt Technology) using a dn/dc value of 0.185 ml/g. The column used for the SEC-MALS analysis was equilibrated with SEC buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM DDM, filtered through 0.22 μm pore size filters (Millipore) at 0.5 ml/min. One hundred microliters of protein solution (10 μM) was injected.

Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded using a JASCO J-815 spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature control. Using a 0.01-cm path length quartz cell (Hellma), protein samples (~ 0.2 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM DDM) were recorded between 190 and 260 nm at 25˚C. The spectra were corrected for buffer contributions and converted to mean residue ellipticity in deg cm^2 $dmol^{-1}$. Spectra were averaged over 5 scans accumulated at 0.5 nm intervals with 50-nm/min scan speed and 5-s response times. They were smoothed using the Stavitzky-Golay convolution filter with a span of 5. The secondary structure proportions were estimated using the deconvolution K2D algorithm on DichroWeb program (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml) [40].

Ligand binding assay and data analysis

The intrinsic fluorescence of cT1R1-NTD was measured as previously described by Nie et al. [37] using a Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian Instruments) equipped with a Peltier temperature control unit. Sample proteins were excited at 295 nm and emission spectra were recorded from 300 to 400 nm, with 5-nm and 10-nm bandwidth for emission and excitation, respectively. For titration experiments, fluorescence spectra were recorded using 0.5 μM protein solution in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM DTT and 0.1 mM DDM. Ligand solutions were freshly prepared in the same buffer. Successive aliquots of potential ligands were added to 400 μL of cT1R1-NTD solution. The temperature was kept constant at 20˚C. Fluorescence measurements were corrected for dilution, bleaching and nonspecific buffer quenching. K_d values and standard errors were calculated from a plot of the ratio between the fluorescence intensity variation and the maximum of fluorescence intensity variation versus

concentration of total ligand, obtained with a standard non-linear regression method and using one site saturation ligand binding equation using SigmaPlot software. To measure the synergism between L-amino acids and IMP, the intensities of fluorescence of cT1R1-NTD were normalized to 0% in presence 0.3 μM IMP alone and 100% at highest concentrations of L-amino acids in absence of IMP. The K_d values of ligand-receptor interactions were determined using Eq (1)

$$\frac{\Delta F}{\Delta Fmax} = \frac{B_{max} \times [L]}{(K_d + [L])} \quad (1)$$

Where K_d value is the apparent dissociation constant, ΔF is the difference between the fluorescence intensity at a given concentration of ligand and the fluorescence intensity in the absence of ligand, and ΔFmax is the difference at infinite ligand concentration [L], B_{max} is the maximum fluorescence signal, [L] corresponds to the concentration of ligands. The reported K_d values are the average of more than nine measurements performed on at least three independently refolded protein samples. IMP and L-amino acids were obtained from Sigma-Aldrich. Statistical analyses: Dunnett's test was used to determine the statistical significance between data means.

Results

Bacterial expression of cT1R1-NTD

Recently, we reported a simple and robust protocol to produce pure and homogenous human T1R3-NTD expressed at milligram levels using *Escherichia coli* [35, 36] following the strategy presented in Fig 1. Biophysical studies demonstrated that human T1R3-NTD is functionally active and able to bind sucralose with a binding affinity in the millimolar range, which is in agreement with that measured with mouse T1R3-NTD [37, 41]. To investigate the structural basis of L-amino acid recognition by cat taste receptors, we used intrinsic tryptophan fluorescence signal to monitor ligand-binding to cT1R1-NTD. For this purpose, we expressed large quantities of recombinant cT1R1-NTD using the *E. coli* prokaryotic expression system as previously reported [35, 36]. SDS-PAGE analysis showed a band migrating at a molecular weight of approximately 55 kDa, in agreement with theoretical molecular mass values (55.4 kDa) calculated from the protein sequence. Soluble and insoluble proteins were separated by centrifugation and analysed using SDS-PAGE. As previously observed for human T1R2- and T1R3-NTDs, we observed that cT1R1-NTD was only detected in the insoluble fraction as inclusion bodies (S3 Fig). All attempts to produce soluble cT1R1-NTD by modifying expression conditions (i.e. IPTG concentration, induction time or temperature) were unsuccessful (S3 Fig). Electrophoresis analysis of purified cT1R1-NTD inclusion bodies showed the presence of a minor protein migrating at a molecular weight of approximately 31 kDa (Fig 2). Protein identification using peptide mass fingerprinting revealed that this protein corresponded to a N-terminal fragment of cT1R1-NTD. We found that induction of protein expression using 0.1 mM IPTG at 20°C for 3 hours reduced the proportion of this truncated form of cT1R1-NTD. cT1R1-NTD inclusion bodies were isolated and purified as previously described [35, 36]. From 1 litre of bacterial culture, we obtained approximately 150 mg of cT1R1-NTD. SDS-PAGE analysis of purified inclusion bodies revealed that cT1R1-NTD protein was more than 90% pure (S2B Fig). To increase the refolding yield of cT1R1-NTD, improvements were made to our previously reported protocol for hT1R3-NTD [35], which is described in S2A Fig. Briefly, cT1R1-NTD was refolded in the presence of a mixture of SDS and DDM, the SDS was removed using precipitation by KCl followed by dialysis. Isolation of the monomeric refolded protein was performed using preparative gel filtration chromatography. As shown in Fig 3,

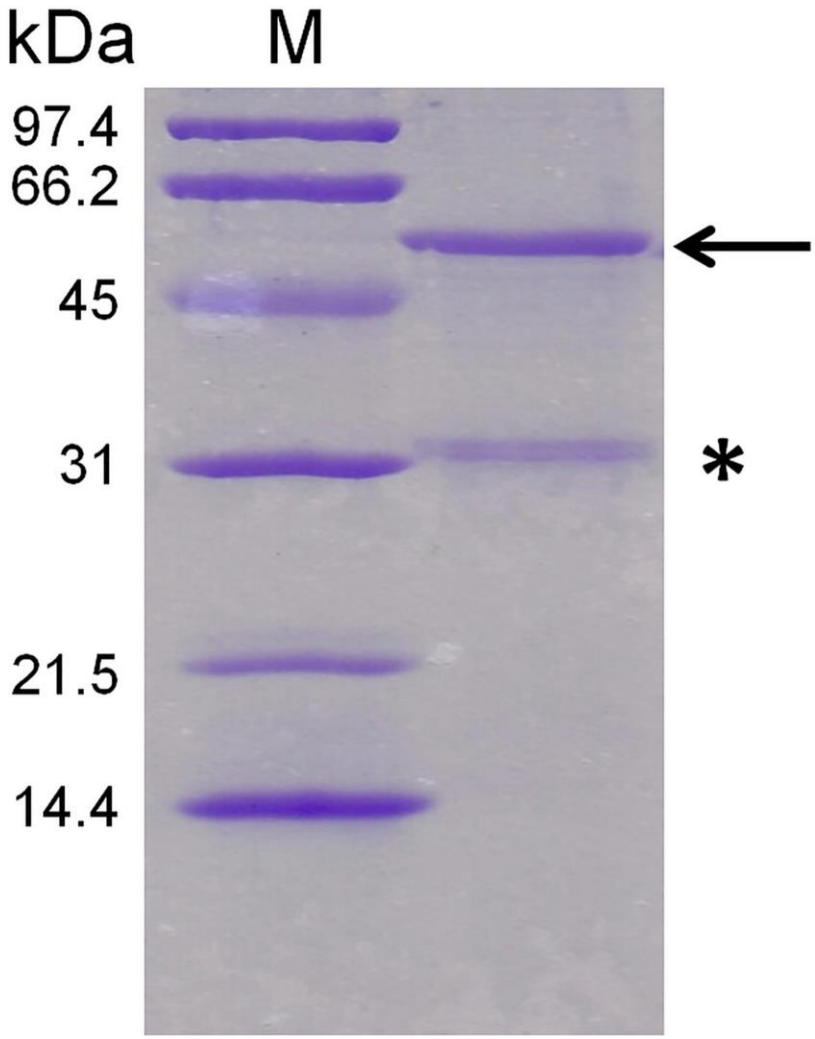

Fig 2. SDS-PAGE analysis of purified cT1R1-NTD inclusion bodies. cT1R1-NTD is indicated with an arrow while the star indicates a band corresponding to a N-terminal fragment of cT1R1-NTD. The proteins were separated by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The molecular mass markers are in lane M.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g002

cT1R1-NTD eluted at approximately 13.75 mL with a purity, as indicated by SDS-PAGE analysis, of more than 95% (S2 Fig). The calibration of the gel filtration column with molecular mass markers confirmed the eluting position of the refolded cT1R1-NTD at a molecular weight of 57 kDa in agreement with a monomeric state of cT1R1-NTD. Western blot analysis using anti-his-tag antibodies confirmed that cT1R1-NTD was the main protein present in the sample (S2C Fig).

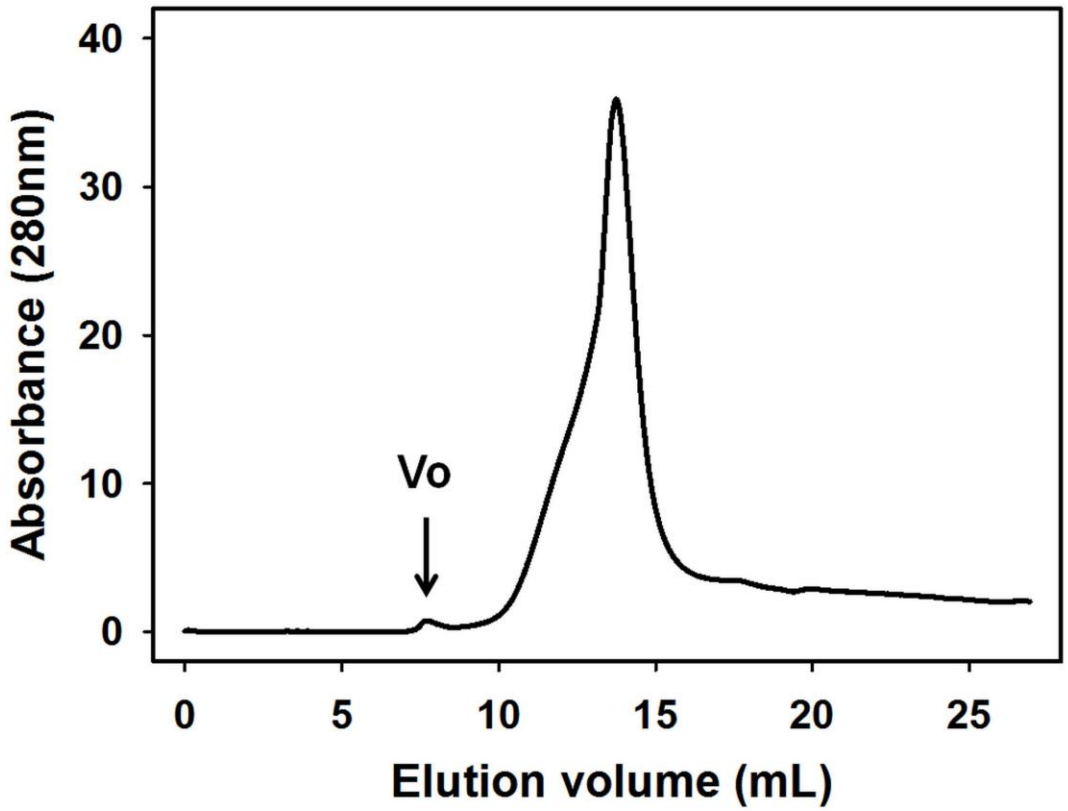

Fig 3. Preparative gel filtration chromatography of refolded cT1R1-NTD. Gel filtration was performed using a Superdex 200 column (10 x 300 mm, 24 mL). The column was equilibrated in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mM DDM. The arrow indicates the position of the void volume (Vo).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g003

Characterisation of cT1R1-NTD

To confirm the folding and structural integrity of refolded cT1R1-NTD, we used CD spectroscopy. The cT1R1-NTD far-UV spectrum displayed a positive peak centered at 193 nm and two negative peaks at 209 and 222 nm characteristic of a folded protein containing helical secondary structures (Fig 4). The deconvolution of the CD spectrum revealed that cT1R1–NTD was composed of approximately 27% α-helix and 20% β-sheet. This composition is consistent with that measured on mouse and human T1R2- and T1R3-NTDs [35, 37]. The fluorescence properties of the tryptophan residues in a protein could be used to probe the refolded state of proteins using denaturing chemicals. For this purpose, we recorded the fluorescence tryptophan spectra of refolded cT1R1-NTD in the absence and presence of 6 M guanidine hydrochloride (S4 Fig). A red-shift of 10 nm (340 to 350 nm) and a 50% increase in fluorescence intensity was observed revealing an increased exposure of tryptophan residues to the solvent. Both of these fluorescent variations confirmed that cT1R1-NTD was folded prior to denaturation. This observation demonstrates the overall structural homogeneity of the protein sample with respect to folding. To evaluate the oligomeric state of purified cT1R1-NTD, we used size-

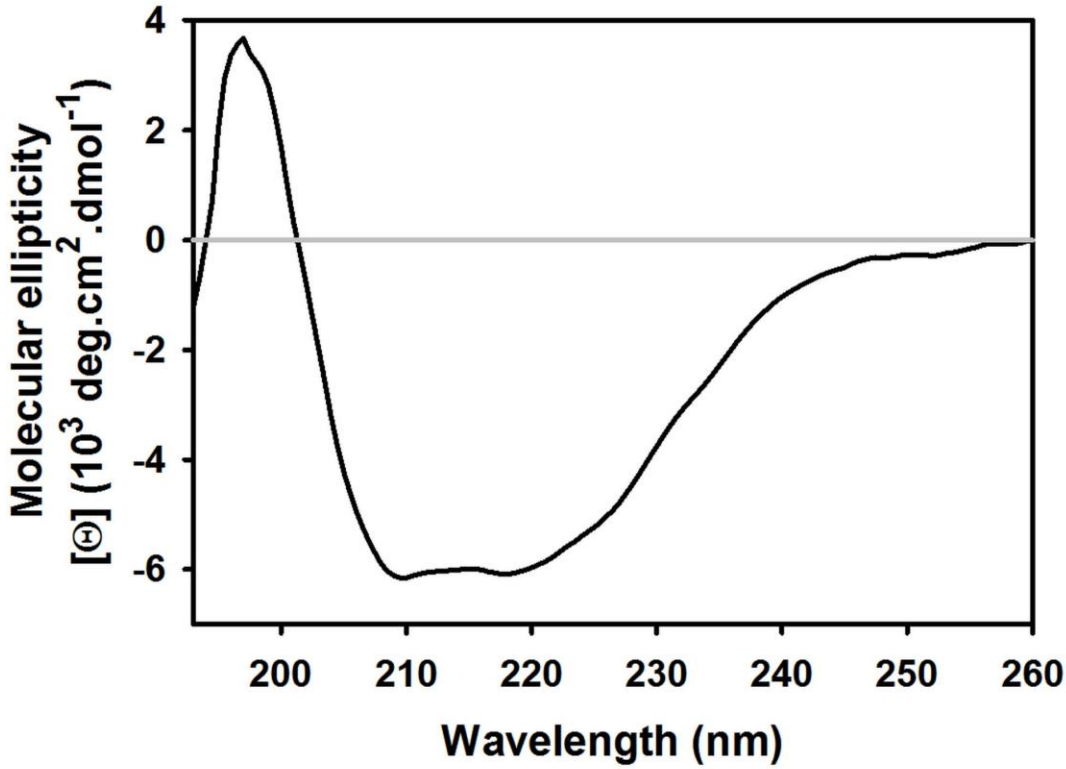

Fig 4. Characterization of cT1R1-NTD using far-UV circular dichroism spectroscopy. Protein concentration in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM DTT and 0.1 mM DDM was approximately 0.2 mg/ml. Light path: 0.01 cm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g004

exclusion chromatography (SEC) in combination with on-line multiangle laser light scattering (MALS) and refractometry. SEC-MALS is valuable to determine the subunit stoichiometry or oligomeric state of proteins in their native form in solution. This technique measures the absolute molecular weight of a protein in solution independently from its shape, elution order or interaction with the column matrix. cT1R1-NTD has a theoretical mass of 55.4 kDa. As shown in Fig 5, SEC-MALS analysis showed that cT1R1-NTD mainly elutes as a monodisperse peak with a measured mass of 52.5 kDa, which is close to the monomer theoretical mass value, suggesting that the refolded protein behaves as a monomer in solution. SEC-MALS analysis revealed the presence of small amounts of aggregates in the sample, which were estimated to be less than 1.3% of the total refolded cT1R1-NTD.

Ligand binding properties of cT1R1-NTD

Cat behavioral experiments and molecular modeling studies have suggested that cat T1R1/T1R3 functions as a broadly tuned L-amino acid receptor [26]. Therefore, we measured the binding affinities of cT1R1-NTD for five L-amino acids belonging to different classes, including aliphatic (L-Ala, L-Ile,), polar (L-Cys), and basic (L-His, L-Arg) amino acids for which, cats have different taste preferences [26]. For this purpose, we determined the concentration-response relationships for the intrinsic tryptophan fluorescence of cT1R1-NTD upon the

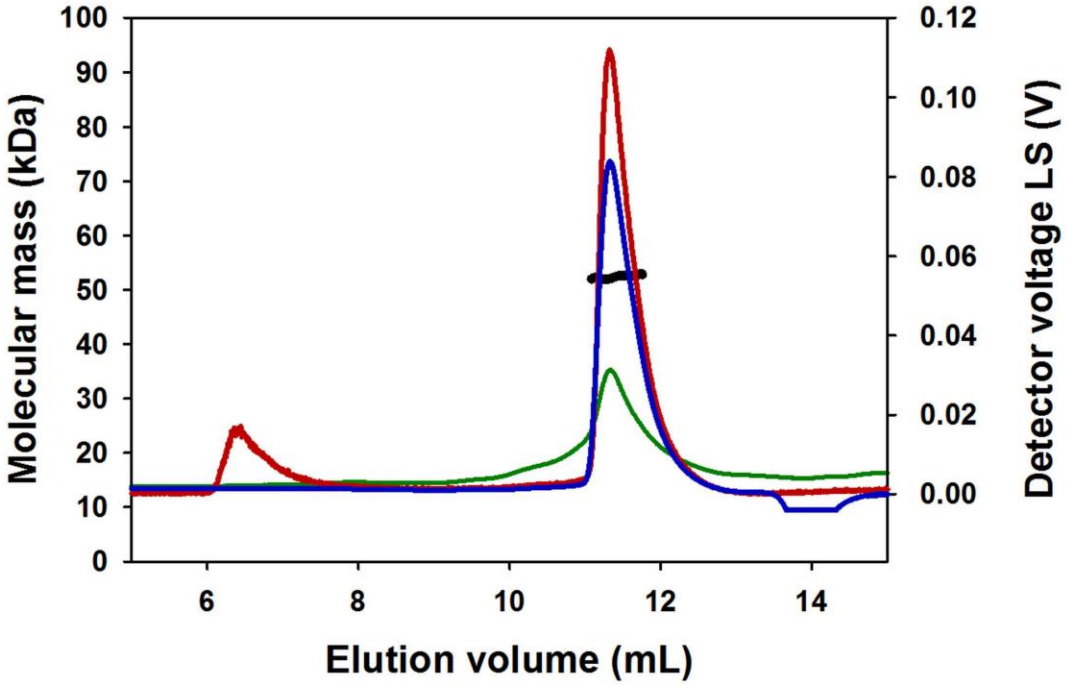

Fig 5. SEC-MALS analysis of cT1R1-NTD. The column was equilibrated and cT1R1-NTD eluted with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM DDM. The chromatograms show the readings of the light scattering (LS), the differential refractive index (dRI) and UV detectors in red, blue and green, respectively. The scale for the LS detector is shown in the right-hand axis. The thick black line indicates the calculated molecular mass of the eluting protein throughout the chromatogram (scale on the left-hand axis). cT1R1-NTD has a fitted molecular mass of 52.5 kDa; its theoretical monomer molecular mass value is 55.4 kDa.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g005

addition of these representative ligands. Because the fluorescence emitted by tryptophan residues is highly sensitive to local environment changes, this technique allows the measurement of protein-ligand interaction in the absence of protein or ligand labeling. This label-free technique has been used to measure protein-ligand binding interaction with class C GPCR NTDs [36, 37, 41–43]. As shown in Fig 6, we found that the L-amino acids, L-Ala, L-Ile, L-Arg and L-His, induced conformational changes in cT1R1-NTD leading to a saturable intrinsic fluorescent enhancement. Titration curves revealed that L-Ala and L-Ile were the ligands with highest affinity, exhibiting K_d values of 3.2 ± 0.3 and 7.3 ± 0.7 μM respectively (Fig 7 and Table 1). In the case of L-Ile, it should be pointed out that at the high concentrations, the binding curve does not clearly form a plateau phase. This lack of plateau could be attributed to the poor aqueous solubility of L-Ile at the highest concentrations. We observed that L-Arg and L-His bound cT1R1-NTD with a lower affinity with K_d values >50 μM. This interaction is specific since the sulfur-containing amino acid (L-Cys) has no effect on the intrinsic fluorescence of cT1R1-NTD (Figs 6 and 7).

Robust synergism between L-Glu and the 5'-monophosphate ribonucleotides IMP and GMP is a hallmark of umami taste in humans and in many animal species [9, 44–46]. Since cats are responsive to IMP and GMP alone [31], we tested these compounds for their ability to affect cT1R1-NTD intrinsic fluorescence. Interestingly, the addition of IMP in the absence of amino acids resulted in an increase of cT1R1-NTD intrinsic fluorescence (Fig 6) leading to a

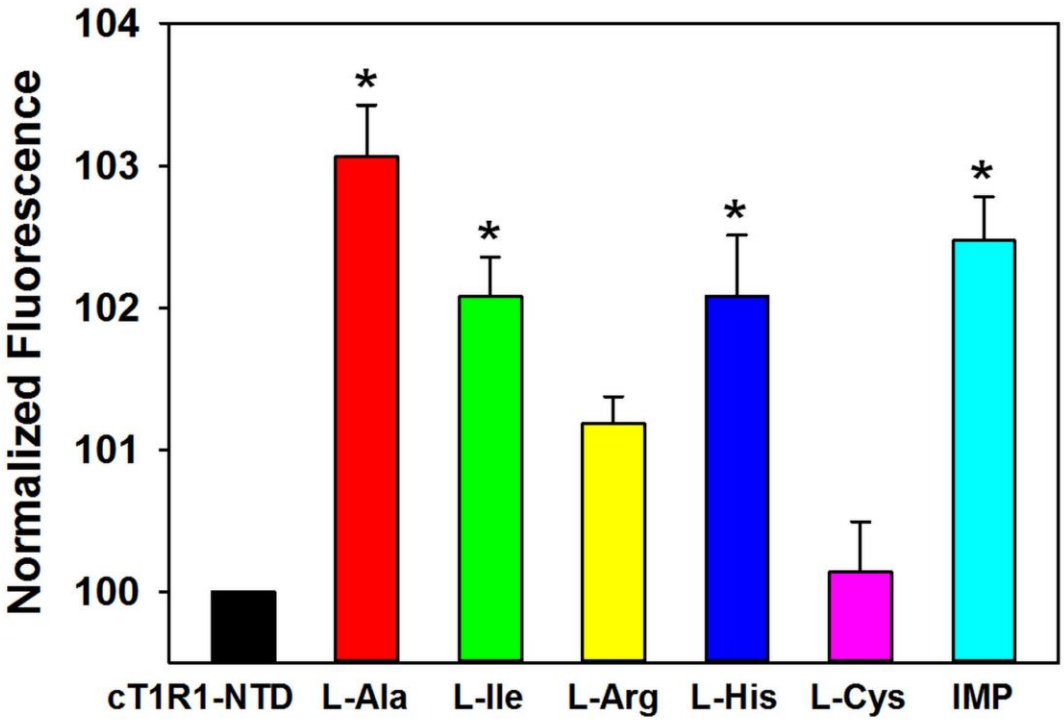

Fig 6. cT1R1-NTD binds L-amino acids and IMP. Normalized maximal fluorescence intensity of cT1R1-NTD before and after addition of ligands (100 μM final concentration). L-Cys does not affect cT1R1-NTD fluorescence. Fluorescence of cT1R1-NTD alone was defined as 100% in absence of ligand. Excitation and emission wavelength were 295 nm and 340 nm, respectively. cT1R1-NTD concentration was 0.5 μM. Data values are the mean ± SEMs of more than nine independent replicates of at least three independently refolded protein samples. *, Significantly different from cT1R1-NTD before addition of ligands (one-way ANOVA followed by Dunnett's, $p \leq 0.05$; for L-Arg $p \leq 0.08$).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g006

K_d value of 0.83 ± 0.06 μM (Fig 7 and Table 1). Upon the addition of GMP alone at low concentrations (below 1 μM) we also measured a fluorescence enhancement, further demonstrating an interaction of this 5'-ribonucleotide with the cT1R1-NTD. Unfortunately, at higher GMP concentrations, we observed a strong decrease of fluorescence due to absorbance of the UV light by this 5'-monophosphate ribonucleotide impairing affinity determination. We then investigated the synergy between L-amino acids and IMP. As expected, low doses of IMP (0.3 μM IMP, final concentration) shifted the binding curves to the left for all tested amino acids (Fig 7). However, we found this synergetic effect was more pronounced for L-His and relatively modest for L-Ala, L-Ile, and L-Arg (Table 1). Interestingly, we noted that the presence of 0.3 μM IMP increased the maximal amplitude of cT1R1-NTD fluorescence induced by L-Arg and L-His, compared to the other tested L-amino acids (Fig 7). The enhancement effect of IMP was specific since the fluorescence enhancement of cT1R1-NTD generated by 0.3 μM IMP in the presence of L-Cys was not significantly different from that observed in the absence of L-Cys (Fig 7 and S5 Fig). Taken together, these results clearly indicate that cT1R1-NTD isolated from inclusion bodies is functional after re-folding and suggest that cat T1R1/T1R3 receptor is broadly activated by many L-amino acids. Finally, our data confirm

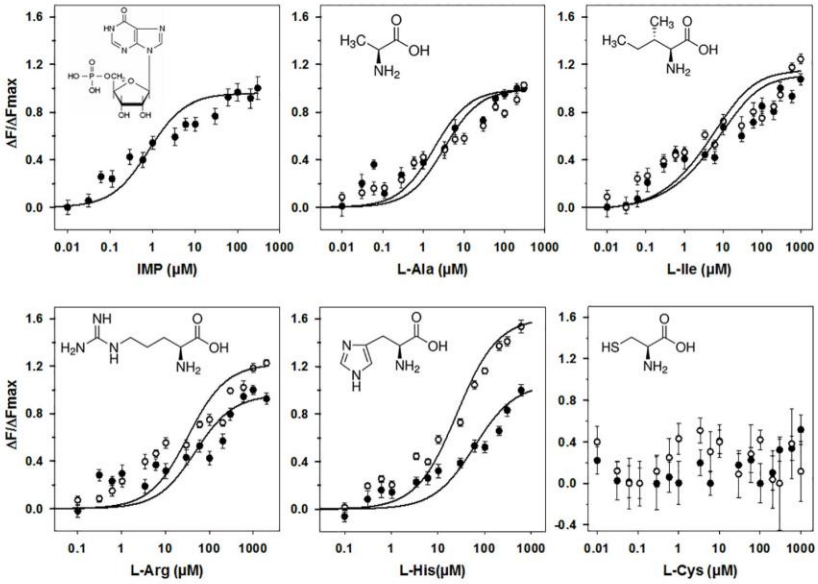

Fig 7. Binding properties of cT1R1-NTD assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. Titration curves of cT1R1-NTD with IMP alone and L-amino acids in the presence (open circles) or absence of 0.3 μM IMP (black circles). Circles show experimental data, while the solid lines are the computed binding curves; excitation and emission wavelength were 295 nm and 340 nm, respectively; cT1R1-NTD concentration 0.5 μM. Fluorescence of cT1R1-NTD alone was defined as 100% in absence of ligand. Data points correspond to mean ± SEMs of more than nine independent replicates of at least three independently refolded protein samples. Data fitted with sigmoid dose-response curves using SigmaPlot software.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.g007

that there is a synergy between amino acids and IMP involved the N-terminal Venus flytrap domain of T1R1.

Discussion

The umami cat receptor subunits (T1R1 and T1R3) belong to class C of GPCRs and play an important role in the detection of L-amino acids, which is especially important for cat food choice as they are obligate carnivores. By combining *in silico* homology models of T1R1 and behavioural experiments, it was proposed that cat T1R1/T1R3 is a broadly-tuned amino acid receptor able to recognize eleven naturally-occurring amino acids in synergy with the ribonucleotides IMP and GMP [26].

Table 1. Dissociation constants (K_d) values of ligands for cT1R1-NTD.

Ligand	K_d [μM] No IMP	K_d [μM] 0.3 μM IMP
IMP	0.83 ± 0.06	-
L-Ala	3.2 ± 0.3	1.8 ± 0.1
L-Ile	7.3 ± 0.7	4.9 ± 0.6
L-Arg	48.1 ± 1.7	32.9 ± 4.1
L-His	83.4 ± 10.7	20.9 ± 1.4

The K_d values are reported as the mean ± SEM.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187051.t001

Here we show that cT1R1-NTD can be produced as a functionally-active protein in milligram quantities. CD demonstrated that cT1R1-NTD was properly folded with the developed procedure and contained secondary structures that matched with those measured for refolded hT1R3-NTD [35] or those of mT1R2- and mT1R3-NTD produced in bacteria as soluble proteins [37, 41]. In contrast with hT1R3-NTD, which was observed to be a dimer by gel filtration [35], SEC-MALS analysis revealed that cT1R1-NTD exists as a monomer indicating that the protein domain is stable in the absence of its T1R3 binding partner. The oligomeric state of cT1R1-NTD is similar to that observed for the NTDs of $GABA_B$ receptor heterologously expressed by insect cells. $GABA_B$ is formed by the heterodimeric assembly of GBR1 and GBR2 subunits. GBR2-NTD was observed as a monomer, whereas GBR1-NTD was found to occur as a monomer-dimer equilibrium [47]. Recently, Neumket et al [14] solved the crystal structure of the medaka fish T1R2/T1R3 heterodimer. The structure revealed that Cys132 located in loop 2 of T1R3 and Cys344 located in loop 3 of T1R2 forms an inter-subunit disulphide bridge, which is a key for the heterodimer stabilization. In the case of homodimeric calcium-sensing receptor (CaSR) and mGluR1, cysteine residues located in loop 2 form intermolecular bridge(s) between subunits [13, 48]. Since cat T1R1 has no cysteine residues in loop 2, but does have a cysteine residue present in loop 3 (S1 Fig), no disulphide bridges are expected between cT1R1 monomers, in agreement with the measured monomeric state of cT1R1-NTD.

Our intrinsic fluorescence data demonstrated that recombinant cT1R1-NTD was able to bind various L-amino acids suggesting that cat T1R1/T1R3 is a broadly tuned amino acid receptor as previously reported for the mouse T1R1/T1R3 [8, 15]. We measured affinities in the micromolar range with dissociation constant values lower than predicted values deduced from behavioural experiments conducted on cats [26] or half maximal effective concentration (EC_{50}) values from mouse or human T1R1/T1R3 receptor measured using a calcium-based cellular assay [8, 15, 49, 50]. Interestingly, Nie et al (2005) have already reported slightly lower K_d values for mouse T1R2-NTD compared to predicted values deduced from rodent behavioural studies or receptor functional assays [37]. Possible explanations could be a low coupling efficiency of this receptor to the artificially created signalling cascade in the cellular assay or the impact of receptor heterodimerization on receptor sensitivity. Thus, it has been observed that the interaction of GBR1-NTD with GBR2-NTD affects the affinity of GBR1-NTD for agonist [47]. Our study showed that L-Ala and L-His bind to cT1R1-NTD in agreement with the clear preference of cats for water supplemented with these amino acids [26]. We observed that cT1R1-NTD also bound the negatively charged amino acid, L-Arg although cats do not show a preference for this compound in solution [26]. The cat aversion for L-Arg can be explained by the high pH value of the non-buffered amino acid solutions known to be aversive for cats [24]. This hypothesis could also explain the discrepancy of cat preference observed for instance for L-Lys solution [26, 27]. In addition, the possibility of a negative off-taste as bitter, generated by L-Arg could not be excluded [24].

Conversely, we observed that the sulphur-containing L-Cys, a palatable amino acid for cats, does not interact with cT1R1-NTD [26] whereas this amino acid was reported to be a strong agonist of mouse T1R1/T1R3 [51]. The absence of L-Cys binding onto cT1R1-NTD could be explained by species-dependent differences or more probably the presence of additional cat umami receptors as proposed in rodents [16–21]. However, as pointed out by Toda et al. [15], we cannot exclude the problem of L-Cys chemical instability in our assay buffer. Although the Venus flytrap domain of T1R1 has been demonstrated to be responsible for amino acid and IMP recognition [11, 12, 15], we cannot fully exclude the possibility that T1R3-NTD participates in the binding of some amino acids or modifies the binding specificity of T1R1-NTD. Thus, mouse and human T1R3-NTD have been shown to bind sweet molecules such as natural

sugars and sucralose [35, 37]. The amino acid binding properties of cat T1R3-NTD should be clarified in future studies.

Importantly, our data revealed that the L-amino acid binding onto cT1R1-NTD is enhanced by low doses of IMP (0.3 μM) further demonstrating that cT1R1-NTD is properly refolded and functional. This observation is in agreement with the molecular mechanism of synergy demonstrated with human T1R1/T1R3 umami receptor in which, IMP binds to close to the hinge region of T1R1-NTD, and IMP bind to an adjacent site stabilizing the NTD of T1R1 in its closed conformation [12]. Our study revealed that the synergistic effect of IMP depends on the nature of the L-amino acids, in good agreement with functional studies on mouse T1R1/T1R3 [8, 15]. We also observed that the presence of IMP enhanced the maximal fluorescence amplitude of cT1R1-NTD for some L-amino acids such as L-His and L-Arg. We can speculate that the synergistic effect of IMP and these amino acids leads to a different conformation change of cT1R1-NTD, which could affect the efficacy of these ligands to activate the cat T1R1/T1R3 receptor. This hypothesis could be validated by combining biophysical approaches, site-directed mutagenesis and functional expression studies conducted on the full-length receptor. Additionally, our data provide evidence through direct binding interaction that IMP binds cT1R1-NTD in the absence of L-amino acids. In humans, it is still controversial if 5'-ribonucleotides, IMP and GMP generate an umami taste by themselves or synergise with the low concentration of free L-Glu naturally present in human saliva [9, 52]. Our results strongly suggest that cat T1R1/T1R3 receptor is activated by IMP in the absence of amino acids encouraging us to speculate that a similar phenomenon may occur in the human umami receptor.

In summary, our study demonstrated that cT1R1-NTD is able to bind L-amino acids with K_d values in the micromolar range and compatible with values predicted from cat behavioural experiments. In addition, we demonstrated a positive allosteric effect of the 5'-monophosphate ribonucleotide, IMP on L-amino acid binding, which is the hallmark of umami taste. Our approach will be valuable to produce a large amount of purified proteins required for structural studies including NMR spectroscopic analyses or crystallization trials. Finally, it offers an interesting new experimental strategy to screen new umami tastants or umami enhancers.

Supporting information

S1 Fig. Amino acid sequence of cT1R1-NTD. cT1R1-NTD sequence (Leu21-Ser495) is in green. Numbers refer to amino acid residues of cT1R1 (Signal peptide: 1–20). His-Tags and thrombin cleavage site are shown in yellow and pink, respectively. The cysteine residue located in loop 3 expected to form a disulphide bridge between cT1R1 and cT1R3 subunits is shown in grey.
(TIF)

S2 Fig. Production of pure refolded cT1R1-NTD. (A) Schematic summary of key steps in the production of pure refolded cT1R1-NTD. Blue numbers on the left indicate samples analyzed by SDS-PAGE (B) and western-blot analysis using anti-his-tag antibodies (C). The proteins were separated by 4–15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The molecular mass markers are in lane M. Presence of cT1R1-NTD was probed using Western-blot analysis. Proteins were separated by 4–15% SDS-PAGE followed by electroblotting to a PVDF membrane using the mouse anti-his monoclonal antibody (1:2,000) and HRP-conjugated goat antimouse IgG (1:50,000) as a secondary antibody.
(TIF)

S3 Fig. SDS-PAGE analysis of cT1R1-NTD expressed in bacteria. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with pET28-cT1R1-NTD before and after IPTG induction for 1, 2 and 3 hours. Soluble and insoluble protein fractions (inclusion bodies) were separated and loaded onto 12% SDS-polyacrylamide gel with size control of molecular mass markers (lane M). Proteins were stained with Coomassie blue. Position of cT1R1-NTD is indicated by an arrow.
(TIF)

S4 Fig. Characterization of cT1R1-NTD folding. cT1R1-NTD intrinsic tryptophan fluorescence in the absence (solid line) and presence of 6M guanidine hydrochloride (GuCl) (dashed line). Excitation wavelength 295 nm and temperature of the cuvette was maintained at 20˚C.
(TIF)

S5 Fig. IMP did not enhance binding of L-Cys onto cT1R1-NTD. Normalized maximal fluorescence intensity of cT1R1-NTD in the presence and absence of L-amino acids (100 μM final concentration). L-Cys does not affect cT1R1-NTD fluorescence. Fluorescence of cT1R1-NTD alone was defined as 100% in absence of ligand. Excitation and emission wavelength were 295 nm and 340 nm, respectively. cT1R1-NTD concentration was 0.5 μM. Data values are the means ± SEMs of more than nine independent replicates of at least three independently refolded protein samples. *, Significantly different from tastant L-Cys (one-way ANOVA followed by Dunnett's, $p \leq 0.05$).
(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: Andrew J. Taylor, Scott McGrane, Loïc Briand.

Formal analysis: Christine Belloir, Jimmy Savistchenko, Fabrice Neiers.

Investigation: Christine Belloir, Jimmy Savistchenko, Fabrice Neiers.

Validation: Christine Belloir, Jimmy Savistchenko, Fabrice Neiers.

Writing – original draft: Jimmy Savistchenko, Loïc Briand.

Writing – review & editing: Andrew J. Taylor, Scott McGrane, Loïc Briand.

References

1. Ninomiya Y, Funakoshi M. Behavioral discrimination between glutamate and the four basic taste substances in mice. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 1989; 92(3):365–70. PMID: 2565787
2. Stapleton JR, Luellig M, Roper SD, Delay ER. Discrimination between the tastes of sucrose and monosodium glutamate in rats. Chem Senses. 2002; 27(4):375–82. PMID: 12006377
3. Hellekant G, Danilova V, Ninomiya Y. Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, Macaca mulatta. J Neurophysiol. 1997; 77(2):978–93. PMID: 9065862
4. Danilova V, Roberts T, Hellekant G. Responses of single taste fibers and whole chorda tympani and glossopharyngeal nerve in the domestic pig, Sus scrofa. Chem Senses. 1999; 24(3):301–16. PMID: 10400449
5. Kendig DM, Hurst NR, Bradley ZL, Mahavadi S, Kuemmerle JF, Lyall V, et al. Activation of the umami taste receptor (T1R1/T1R3) initiates the peristaltic reflex and pellet propulsion in the distal colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014; 307(11):G1100–7. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00251.2014 PMID: 25324508
6. Roura E, Humphrey B, Klasing K, Swart M. Is the pig a good umami sensing model for humans? A comparative taste receptor study. Flavour Frag J. 2011; 26(4):282–5.

7. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(7):4692–6. https://doi.org/10.1073/pnas.072090199 PMID: 11917125
8. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, et al. An amino-acid taste receptor. Nature. 2002; 416(6877):199–202. https://doi.org/10.1038/nature726 PMID: 11894099
9. Yamaguchi S. Basic properties of umami and effects on humans. Physiol Behav. 1991; 49(5):833–41.
10. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. Cell. 2001; 106(3):381–90. PMID: 11509186
11. Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(39):14258–63. https://doi.org/10.1073/pnas.0404384101 PMID: 15353592
12. Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Xu H, Pronin A, Liu H, et al. Molecular mechanism for the umami taste synergism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(52):20930–4. https://doi.org/10.1073/pnas.0810174106 PMID: 19104071
13. Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. Nature. 2000; 407(6807):971–7. https://doi.org/10.1038/35039564 PMID: 11069170
14. Nuemket N, Yasui N, Kusakabe Y, Nomura Y, Atsumi N, Akiyama S, et al. Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. Nat Commun. 2017; 8:15530. https://doi.org/10.1038/ncomms15530 PMID: 28534491
15. Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, et al. Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). The Journal of biological chemistry. 2013; 288(52):36863–77. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494443 PMID: 24214976
16. Delay ER, Kondoh T. Dried bonito dashi: taste qualities evaluated using conditioned taste aversion methods in wild-type and T1R1 knockout mice. Chem Senses. 2015; 40(2):125–40. https://doi.org/10.1093/chemse/bju067 PMID: 25604941
17. Kusuhara Y, Yoshida R, Ohkuri T, Yasumatsu K, Voigt A, Hubner S, et al. Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. J Physiol. 2013; 591(7):1967–85. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.236604 PMID: 23339178
18. Pal Choudhuri S, Delay RJ, Delay ER. L-Amino Acids Elicit Diverse Response Patterns in Taste Sensory Cells: A Role for Multiple Receptors. PLoS One. 2015; 10(6):e0130088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130088 PMID: 26110622
19. Saites LN, Goldsmith Z, Densky J, Guedes VA, Boughter JD Jr. Mice perceive synergistic umami mixtures as tasting sweet. Chem Senses. 2015; 40(5):295–303. https://doi.org/10.1093/chemse/bjv010 PMID: 25820205
20. Chaudhari N, Pereira E, Roper SD. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. Am J Clin Nutr. 2009; 90(3):738s–42s. https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462H PMID: 19571230
21. Maruyama Y, Pereira E, Margolskee RF, Chaudhari N, Roper SD. Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. J Neurosci. 2006; 26(8):2227–34. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4329-05.2006 PMID: 16495449
22. Lei W, Ravoninjohary A, Li X, Margolskee RF, Reed DR, Beauchamp GK, et al. Functional Analyses of Bitter Taste Receptors in Domestic Cats (Felis catus). PLoS One. 2015; 10(10):e0139670. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139670 PMID: 26488302
23. Sandau MM, Goodman JR, Thomas A, Rucker JB, Rawson NE. A functional comparison of the domestic cat bitter receptors Tas2r38 and Tas2r43 with their human orthologs. BMC Neurosci. 2015; 16:33. https://doi.org/10.1186/s12868-015-0170-6 PMID: 26037485
24. Bradshaw JWS. Sensory and experiential factors in the design of foods for domestic dogs and cats. Proc Nutr Soc. 1991; 50(01):99–106.
25. Bradshaw JWS. The Evolutionary Basis for the Feeding Behavior of Domestic Dogs (Canis familiaris) and Cats (Felis catus). J Nutr. 2006; 136(7):1927S–31S.
26. McGrane, S., Hernangomez de Alvaro, C., Gibbs, M., Fine, R., Klebansky, B. and Taylor, A.J. (2014). Understanding Cat Umami Flavour Perception Through in vivo and in silico Studies. In Current Topics in Flavor Chemistry and Biology. Proc. Conf. 10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology, 2013, Eisenach, Germany, pp.35-40.
27. White TD, Boudreau JC. Taste preferences of the cat for neurophysiologically active compounds. Physiol Psychol. 1975; 3(4):405–10.
28. McGrane S, Taylor A, inventors; MARS, Inc. (Waltham Centre for Pet Nutrition, GB), assignee. Flavour Additives 2014, Patent application WO 2014/068043.

29. Yoshii K, Yokouchi C, Kurihara K. Synergistic effects of 5'-nucleotides on rat taste responses to various amino acids. Brain Res. 1986; 367(1–2):45–51. PMID: 3008926

30. Li X, Li W, Wang H, Cao J, Maehashi K, Huang L, et al. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. PLoS Genet. 2005; 1(1):27–35. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010003 PMID: 16103917

31. Bachmanov AA, Bosak NP, Lin C, Matsumoto I, Ohmoto M, Reed DR, et al. Genetics of taste receptors. Curr Pharm Des. 2014; 20(16):2669–83. PMID: 23886383

32. Li R, Fan W, Tian G, Zhu H, He L, Cai J, et al. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature. 2010; 463(7279):311–7. https://doi.org/10.1038/nature08696 PMID: 20010809

33. Baldwin MW, Toda Y, Nakagita T, O'Connell MJ, Klasing KC, Misaka T, et al. Sensory biology. Evolution of sweet taste perception in hummingbirds by transformation of the ancestral umami receptor. Science. 2014; 345(6199):929–33. PMID: 25146290

34. Ariyasu T, Matsumoto S, Kyono F, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, et al. Taste receptor T1R3 is an essential molecule for the cellular recognition of the disaccharide trehalose. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2003; 39(1–2):80–8. https://doi.org/10.1290/1543-706X(2003)039<0080:TRTIAE>2.0.CO;2 PMID: 12892531

35. Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L, Briand L. Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. Protein Expr Purif. 2012; 83(1):75–83. https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.03.006 PMID: 22450161

36. Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L, Briand L. An efficient Escherichia coli expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. Bioengineered. 2013; 4(1):25–9. https://doi.org/10.4161/bioe.21877 PMID: 22909933

37. Nie Y, Vigues S, Hobbs JR, Conn GL, Munger SD. Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. Curr Biol. 2005; 15(21):1948–52. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.037 PMID: 16271873

38. Raliou M, Grauso M, Hoffmann B, Schlegel-Le-Poupon C, Nespoulous C, Debat H, et al. Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. Chem Senses. 2011; 36(6):527–37. https://doi.org/10.1093/chemse/bjr014 PMID: 21422378

39. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680–5. PMID: 5432063

40. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. Nucleic Acids Res. 2004; 32(Web Server issue):W668–73. https://doi.org/10.1093/nar/gkh371 PMID: 15215473

41. Nie Y, Hobbs JR, Vigues S, Olson WJ, Conn GL, Munger SD. Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. Chem Senses. 2006; 31(6):505–13. https://doi.org/10.1093/chemse/bjj053 PMID: 16621970

42. Huang Y, Zhou Y, Castiblanco A, Yang W, Brown EM, Yang JJ. Multiple Ca(2+)-binding sites in the extracellular domain of the Ca(2+)-sensing receptor corresponding to cooperative Ca(2+) response. Biochemistry. 2009; 48(2):388–98. https://doi.org/10.1021/bi8014604 PMID: 19102677

43. Suzuki Y, Moriyoshi E, Tsuchiya D, Jingami H. Negative cooperativity of glutamate binding in the dimeric metabotropic glutamate receptor subtype 1. The Journal of biological chemistry. 2004; 279(34):35526–34. https://doi.org/10.1074/jbc.M404831200 PMID: 15199056

44. Kuninaka A. Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. J Agri Chem Soc Jpn. 1960; 34(7):487–92.

45. Kuninaka A. The Nucleotides, a Rationale of Research on Flavor Potentiation. In: Arthur D. Little C, MA, editor. Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. Symposium on Flavor Potentiation1964. p. 4–9.

46. Sato M, Akaike N. 5'-ribonucleotides as gustatory stimuli in rats electrophysiological studies. Jpn J Physiol. 1965; 15(1):53–70.

47. Geng Y, Xiong D, Mosyak L, Malito DL, Kniazeff J, Chen Y, et al. Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA(B) receptor GBR2. Nat Neurosci. 2012; 15(7):970–8. https://doi.org/10.1038/nn.3133 PMID: 22660477

48. Geng Y, Mosyak L, Kurinov I, Zuo H, Sturchler E, Cheng TC, et al. Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. eLife. 2016; 5.

49. Li X, Inoue M, Reed DR, Huque T, Puchalski RB, Tordoff MG, et al. High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. Mamm Genome. 2001; 12(1):13–6. PMID: 11178737

50. Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Liu H, Xu H, Servant G, et al. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(10):4752–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0911660107 PMID: 20173095

51. Nelson TM, Munger SD, Boughter JD Jr. Taste sensitivities to PROP and PTC vary independently in mice. Chem Senses. 2003; 28(8):695–704. PMID: 14627538

52. Beauchamp GK. Sensory and receptor responses to umami: an overview of pioneering work. Am J Clin Nutr. 2009; 90(3):723s–7s. https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462E PMID: 19571221

II. Article 3 :

The 5'-ribonucleotide IMP interacts with the human TAS1R3 sweet taste subunit to enhance sweet taste detection.

Belloir C, Poirier N, Neiers F, Briand L.

à soumettre à : Scientific Reports

The 5'-ribonucleotide IMP interacts with the human TAS1R3 sweet taste subunit to enhance sweet taste detection

Christine Belloir, Nicolas Poirier, Fabrice Neiers, and Loïc Briand*

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup 21000, France

* Correspondence should be addressed to: Loïc Briand
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université de Bourgogne-Franche Comté, AgroSup, 21000 Dijon, France

Phone: +33-380-693-464
loic.briand@inra.fr

ABSTRACT

Sweet taste perception is mediated by the activation of the heterodimeric receptor made of the assembly of TAS1R2 and TAS1R3 subunits, whereas umami compounds are perceived through the heterodimer complex of TAS1R1 and TAS1R3. TAS1R1, TAS1R2 and TAS1R3 subunits are class C G-protein-coupled receptors (GPCRs) whose members share a common architecture, including a large extracellular domain (ECD) composed of a Venus flytrap (VFT) domain and a cysteine-rich domain (CRD) linked to the seven-transmembrane (7TM) domain. TAS1R2-VFT constitutes the primary ligand-binding site for most of the sweet compounds. In addition, TAS1R3-CRD and -7TM have been shown to interact with some sweet stimuli. TAS1R1-VFT contains the orthosteric binding site for umami compounds where, for example, L-glutamate (L-Glu) binds. Inosine-5'-monophosphate (IMP), known to potentiate umami taste, has been shown to bind to a site adjacent to the L-Glu site, stabilizing the closure of TAS1R1-VFT and leading to umami synergy. To elucidate the contribution of VFTs to umami and sweet detection, we heterologously expressed and purified human TAS1R1- and TAS1R3-VFTs in *Escherichia coli*. Ligand binding studies revealed that TAS1R3-VFT interacts with L-Glu and IMP. Cellular assays based on full-length TAS1R2/TAS1R3 receptor demonstrated that IMP modulates sweet compound detection at the receptor level acting via TAS1R3.

Keywords: taste receptors, sweeteners, umami, TAS1R, ribonucleotides

Introduction

Umami taste detection is mediated by the activation of the obligate heterodimeric receptor, named TAS1R1/TAS1R3, whereas the heterodimeric TAS1R2/TAS1R3 is specific to detecting sweet-tasting compounds (Li *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001). The TAS1R family are class C G-protein-coupled receptors (GPCRs). This family includes metabotropic glutamate receptors (mGluRs), γ-aminobutyric acid B-type receptors ($GABA_BRs$), extracellular calcium-sensing receptors (CaSRs), L-α-amino acid receptor GPRC6A and several orphan receptors, including some pheromone receptors (Brauner-Osborne *et al.* 2007, Pin *et al.* 2003). Class C GPCRs share a common topology made of a large amino-terminal extracellular domain (ECD) that is composed of a Venus flytrap (VFT) domain and a cysteine-rich domain (CRD). The ECD is connected to the seven-transmembrane (7TM) domain by the CRD, except in the $GABA_BR$ subunits, which do not possess a CRD. Structural studies and site-directed mutagenesis have revealed that VFT is composed of two lobes separated by a large cleft forming the main orthosteric ligand-binding site (Kunishima *et al.* 2000, Muto *et al.* 2007). A combination of X-ray crystallography and cryo-electron microscopy has recently revealed the activation mechanism of the homodimeric human mGluR5. Agonist binding to the VFTs leads to a compaction of the inter-subunit dimer interface, bringing the CRD into close proximity. Interactions between the CRDs and the second extracellular loops of the receptor lead to the reorientation of the 7TM, which initiates cascade signalling (Koehl *et al.* 2019).

Despite sharing the TAS1R3 subunit, umami TAS1R1/TAS1R3 and sweet TAS1R2/TAS1R3 taste receptors detect and discriminate different tasting compounds (Behrens *et al.* 2011, Belloir *et al.* 2017a). TAS1R1/TAS1R3 responds to umami compounds such as L-amino acids and some peptides (Li *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001, Toda *et al.* 2013, Xu *et al.* 2004, Zhao *et al.* 2003), whereas TAS1R2/TAS1R3 is involved in the detection of sugars, high-potency sweeteners, some D-amino acids, and sweet-tasting proteins (Jiang *et al.* 2004, Li *et al.* 2002, Masuda *et al.* 2018, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001, Xu *et al.* 2004). Combining site-directed mutagenesis, mouse-human chimeric receptors and cellular-based assays, it has been demonstrated that the VFTs of TAS1R1 and TAS1R2 account for the interaction with umami taste compounds and most sweet compounds, respectively (Li *et al.* 2002, Maillet *et al.* 2015, Masuda *et al.* 2012, Toda *et al.* 2013, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2008). However, other ligand binding sites have been shown on the receptors at the origin of synergy or receptor inhibition. The 7TM of TAS1R2 was shown to interact with the sweet compounds perillartine and S819 (Cai *et al.* 2016, Servant *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2008) and the sweet taste inhibitor amiloride (Zhao *et al.* 2018). The 7TM of TAS1R3 also contains a binding site of some sweeteners, such as cyclamate and neohesperidin dihydrochalcone (NHDC) (Cheron *et al.* 2019, Fujiwara *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2005b, Winnig *et al.* 2005, Xu *et al.* 2004). TAS1R3-7TM also interacts with lactisole and clofibrate, a sweet and an umami taste inhibitor, respectively (Galindo-Cuspinera and Breslin 2006, Kochem and Breslin 2017, Nakagita *et al.* 2019). Cyclamate produces a different effect on the sweet and umami receptors. Cyclamate behaves as an agonist for the sweet taste receptor and as an enhancer for the umami receptor (Zhang *et al.* 2008). We and others demonstrated that TAS1R3-VFT binds natural sugars (sucrose and glucose) and the chlorodeoxysugar sucralose (Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005). However, the role of this VFT and its contribution to heterodimeric sweet receptor function remain

largely unknown. Lastly, the CRD of TAS1R3 has been shown to be crucial for determining the receptor response to the sweet-tasting proteins brazzein and thaumatin (Jiang *et al.* 2004, Masuda *et al.* 2013), but the exact mechanism of receptor activation remains to be elucidated.

A unique feature of umami taste is its potentiation by 5'-ribonucleotides, such as inosine-5'-monophosphate (IMP) and guanosine-5'-monophosphate (GMP) (Li *et al.* 2002, Raliou *et al.* 2011, Smith and Spector 2014). This robust amplification is the hallmark of umami taste. The molecular mechanism of this synergy involving a cooperative model has been elucidated. L-Glu binds in the hinge region of the TAS1R1-VFT, inducing the closure of the VFT, whereas IMP binds to an adjacent site, further stabilizing the closed conformation of the TAS1R1-VFT (Zhang *et al.* 2008). Combining chimeric receptors, site-directed mutagenesis, and molecular modelling approaches, the molecular mechanism of a sweet enhancer has been demonstrated: the enhancer SE-2 binds to TAS1R2-VFT adjacent to the sweetener binding site and follows a similar mechanism as described for the umami taste enhancers IMP and GMP (Zhang *et al.* 2010).

Sensory studies have shown that umami-sweet taste interactions have been reported (Shim *et al.* 2015). A moderate/high concentration of L-Glu suppresses sweet and bitter tastes (Kemp and Beauchamp 1994), whereas 5'-ribonucleotides such as IMP enhance sweetness perception (Woskow 1969). Using functional expression of the human TAS1R2/TAS1R3 sweet taste receptor, it has been demonstrated that umami compounds, including L-Glu, 5'-mononucleotides (IMP and GMP) and some glutamyl-dipeptides, inhibit the activation of the receptor by sweeteners (sucrose and acesulfame-K) that bind TAS1R2-VFT, but not by cyclamate, which interacts with the TAS1R3-7TM (Shim *et al.* 2015). While the roles of the individual subunits TAS1R1 and TAS1R2 in the interaction with umami and sweet compounds have been investigated (Li *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001, Toda *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2008), the role of the TAS1R3 subunit in umami detection remains largely unknown.

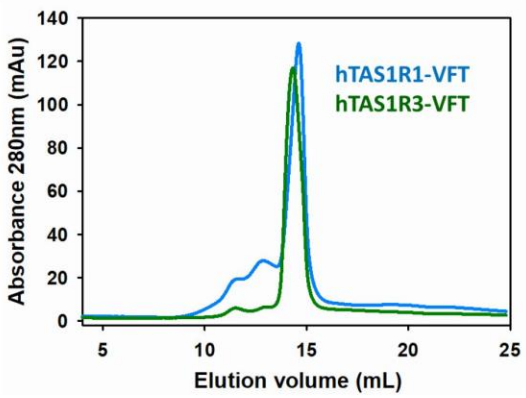

Figure 1. Gel filtration analysis of refolded hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs. The chromatography was performed using a Superdex 200 10/300GL column with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT and 0.1 mM DDM as elution buffer.

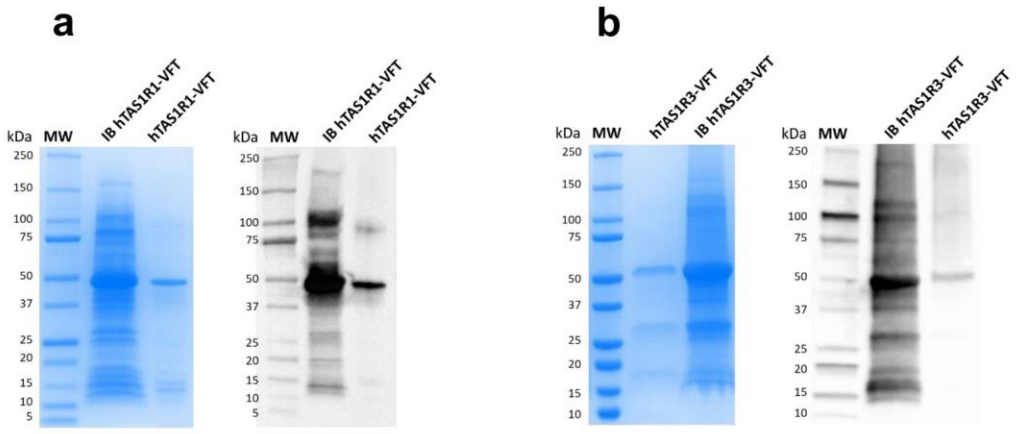

Figure 2. SDS-PAGE and Western blot analysis of purified inclusion bodies of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs. The protein sample, inclusion bodies (IB) and purified hTAS1R-VFTs after gel filtration were separated by 4-15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue or analysed by Western blotting using the anti-His antibody. (**a**) hTAS1R1-VFT; (**b**) hTAS1R3-VFT. The molecular weight (MW) standards (BioRad) are shown.

To better understand the structural basis of umami stimulus recognition by the umami receptor, we measured the binding of umami stimuli to human VFT of TAS1R1 and TAS1R3 (hTAS1R1-VFT and hTAS1R3-VFT). For this purpose, we overexpressed these two ligand-binding domains in *E. coli* as previously described (Belloir *et al.* 2017b, Maitrepierre *et al.* 2012, Maitrepierre *et al.* 2013, Raliou *et al.* 2011). Binding experiments confirmed that purified hTAS1R1-VFT bound the two L-amino acids L-Glu and L-Asp and IMP with distinct affinities and ligand binding-induced conformational changes. We also observed that IMP induced a positive synergistic effect on L-Glu and L-Asp binding. Interestingly, we found that hTAS1R3-VFT bound L-Glu and IMP. Since the TAS1R3 subunit is common to the sweet and umami taste receptors, we hypothesized that IMP should affect sweet taste receptor activation. Using a cellular-based assay, we demonstrated that IMP enhances the response of the human sweet taste TAS1R2/TAS1R3 receptor stimulated by sucralose and neotame.

Results

Expression and biophysical characterization of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs

In order to assess the role of each subunit in umami taste receptor function, we produced recombinant hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs in bacteria as previously reported (Maitrepierre *et al.* 2013). This strategy was previously used to express functionally active cat umami TAS1R1-VFT (Belloir *et al.* 2017b) and human TAS1R3-VFT (Maitrepierre *et al.* 2012). The cDNAs coding for TAS1R1- and TAS1R3-VFTs were cloned into the bacterial expression vector pET28a and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) cells (Supplemental Figure S1a, b). SDS-PAGE and Western blot analysis showed a band migrating at around 50 kDa

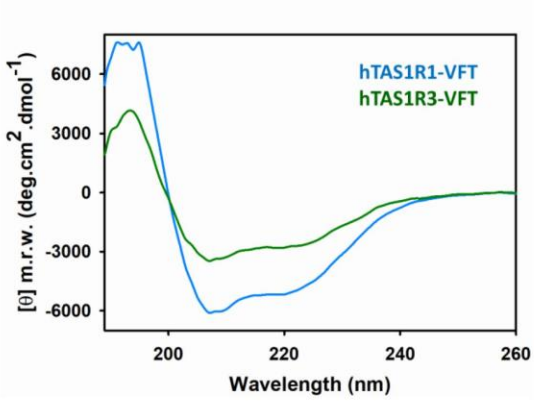

Figure 3. Secondary structure determination by circular dichroism. The far-UV CD spectra of purified hTAS1R1-VFT (blue line) and hTAS1R3-VFT (green line) were recorded after protein concentration. Light path: 0.01 cm. The spectra reveal the presence of a high content of α-helical secondary structures. The deconvolution of the CD spectra revealed that hTAS1R1-VFT was composed of approximately 67% α-helices and 10% β-sheets, compared to 45% α-helices and 12% β-sheets for hTAS1R3-VFT.

(Supplemental Figure S1c, d), revealing that hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs were highly expressed after IPTG induction. Inclusion bodies were isolated, washed and approximately 185 mg and 45 mg of were obtained from 1 L of bacterial culture for hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs, respectively. hTAS1R1- and hTAS1R3-VFT proteins were refolded using the protocol previously described (Belloir *et al.* 2017b) with slight modifications (Supplemental Figure S2). Isolation of the monomeric refolded proteins was performed using size-exclusion chromatography. As shown in Figure 1, hTAS1R1-VFT and hTAS1R3-VFT eluted at 14.5 ml as a single well-defined peak. The calibration of the column with molecular mass markers (Supplemental Figure S3) indicated that proteins had apparent molecular masses of 56 kDa and 60 kDa for hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs, respectively, in agreement with monomeric structures of both proteins. SDS-PAGE and Western blot analysis using anti-His-tag antibodies of the eluted fractions confirmed that hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs were the main proteins present in the samples (Figure 2). To confirm the correct folding of hTAS1R- and hTAS1R3-VFTs, we used circular dichroism (CD) spectroscopy, which is sensitive to secondary structures. CD spectra (Figure 3) displayed α-helix-dominant secondary structures with a positive peak centred at 193 nm and two negative peaks, at wavelengths of 208 nm and 222 nm, for both VFTs. The deconvolution of the CD spectrum revealed that hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs had a high content of helical secondary structures, in accordance with those measured in human and mouse TAS1R2- and TAS1R3-VFTs (Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005).

The oligomeric state of hTAS1R3- and hTAS1R1-VFTs was further analysed using size-exclusion chromatography (SEC) coupled to multiangle laser light scattering (MALS). SEC-MALS is a valuable technique to determine the oligomeric state of proteins in their native form in solution. SEC-MALS analysis (Supplemental Figure S4) shows that hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs elute as monodisperse peaks with measured masses of 55 kDa and 56 kDa, respectively. These data confirmed the monomeric structure of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs. The fluorescence properties of the tryptophan residues in a protein can be used to probe the refolded state of proteins using denaturing chemicals. For this purpose, we recorded the intrinsic tryptophan fluorescence spectra in the presence and absence of guanidine hydrochloride (GuCl) as a chaotropic agent. Denaturation of hTAS1R1 and hTAS1R3-VFTs with 6 M GuCl caused a red shift of the

emission maximum from 335 to 350 nm and a 20% decrease in fluorescence intensity (Supplemental Figure S5), indicating that both proteins were folded prior to denaturation. These results indicate that both hTAS1R-VFTs were folded correctly after purification and that the proteins were suitable for subsequent functional analyses.

Umami compounds bind both hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs

To determine the distinct contributions of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFT subunits to the detection of umami stimuli, we measured their interaction with two umami compounds: L-Glu and L-Asp. To do this, we determined the concentration-response relationships for the peak intrinsic tryptophan fluorescence of the TAS1R-VFT proteins upon titration of these umami compounds. This fluorescence technique has been applied successfully to measure protein-ligand binding interactions with class C GPCR VFTs, including TAS1R receptors (Belloir *et al.* 2017b, Huang *et al.* 2009, Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2006, Nie *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2004). We found that L-Glu and L-Asp induced conformational changes in hTAS1R1-VFT, leading to a saturable intrinsic fluorescence enhancement exhibiting K_d values of 0.11 ± 0.03 and 0.21 ± 0.06 µM, respectively (Figure 4a, Table 1). The interactions of these amino acids with TAS1R-VFT are specific since D-Glu, which is not perceived as umami by humans (Yamaguchi 1991) and which does not activate the human umami TAS1R1/TAS1R3 receptor (Li *et al.* 2002), has no impact on the fluorescence intensity of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs (Figure 4a). A synergistic effect between L-Glu and the 5'-ribonucleotide IMP is a hallmark of umami taste in humans and in many animal species (Kuninaka 1960, Kuninaka 1964, McGrane *et al.* 2014, McGrane and Taylor 2014, Sato and Akaike 1965, Yamaguchi 1991). Since the molecular mechanism of IMP synergy involved TAS1R1-VFT (Zhang *et al.* 2008), we investigated this compound alone for its ability to affect hTAS1R1-VFT intrinsic fluorescence. The addition of IMP in the absence of L-amino acids resulted in a saturable decrease of hTAS1R1-VFT fluorescence, leading to K_d values of 0.06 ± 0.02 µM (Figure 4a, Table 1). This observation suggests a binding-dependent conformational change different from that induced by L-Glu and L-Asp binding. We also investigated the synergy between IMP and the two umami L-amino acids. We observed that low doses of IMP (0.3 µM IMP, final concentration) decreased the maximal amplitude of hTAS1R1-VFT fluorescence induced by L-Glu and L-Asp, leading to nearly identical K_d values (Figure 4b, Table 1).

Ligand	K_d hTAS1R1-VFT (µM)	K_d hTAS1R3-VFT (µM)
L-Glu	0.11 ± 0.03	0.75 ± 0.20
L-Glu + IMP	0.16 ± 0.04	1.37 ± 0.30
L-Asp	0.21 ± 0.06	1.18 ± 0.33
L-Asp + IMP	1.49 ± 0.64	1.41 ± 0.46
IMP	0.06 ± 0.02	0.22 ± 0.07
D-Glu	/	/

Table 1. Binding properties of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFT proteins assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. The dissociation constants (Kd) values are reported as the mean ± SEM.

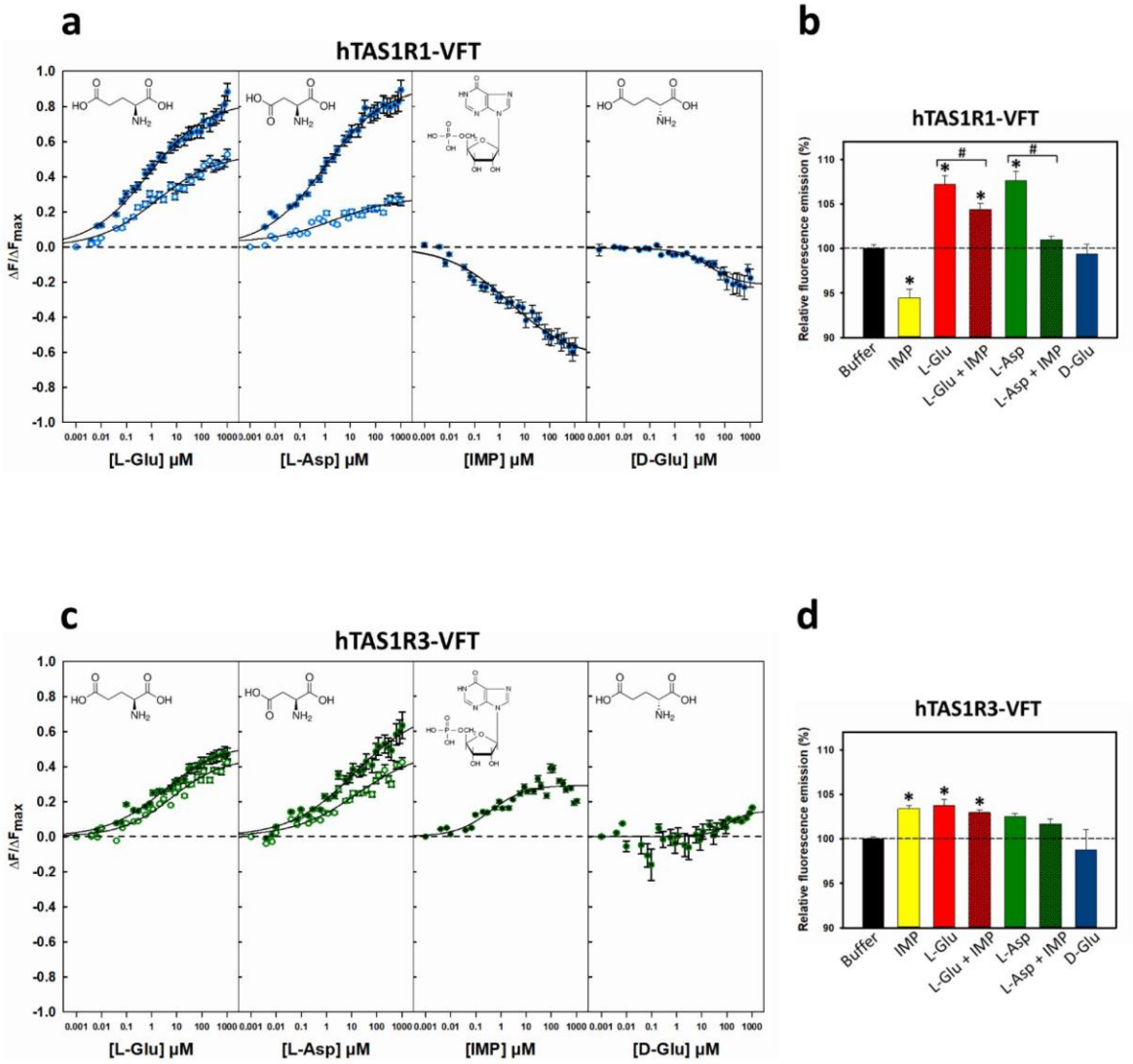

Figure 4. hTAS1R-VFTs bind L-amino acids and IMP. Titration curves of (**a**) hTAS1R1-VFT and (**c**) hTAS1R3-VFT with IMP alone and L-amino acids in the presence (open circles) or absence of 0.3 µM IMP (filled circles). Circles show experimental data, while the solid lines are the computed binding curves; excitation and emission wavelengths were 295 nm and 340 nm, respectively; hTAS1R-VFT concentration was 0.5 µM. Data points correspond to mean ± SEM of more than ten independent replicates of at least six independently refolded protein samples. Data were fitted with sigmoid dose-response curves using SigmaPlot software.
(**b**) and (**d**) Intrinsic tryptophan fluorescence of hTAS1R-VFTs alone was defined as 100% in the absence of ligand. Normalized maximal fluorescence intensity of (**a**) hTAS1R1-VFT and (**b**) hTAS1R3-VFT before and after addition of ligands (30 µM final concentration) in the presence or absence of 0.3 µM for IMP). D-Glu does not affect hTAS1R-VFT fluorescence. *, # Significantly different from hTAS1R-VFT before addition of ligands (one-way ANOVA followed by Dunnett's, $p \leq 0.05$).

We measured the interaction of hTAS1R3-VFT with the two umami L-amino acids. Interestingly, we observed that hTAS1R3-VFT exhibited a dose-dependent increase in intrinsic fluorescence by L-Glu and L-Asp with K_d values of 0.75 ± 0.20 and 1.18 ± 0.33 µM, respectively (Figure 4c, Table 1), but not D-Glu, used as a control (Figure 4c). However, the K_d values were different from those measured for hTAS1R1-VFT (Table 1). Surprisingly, we found that hTAS1R3-VFT exhibited a dose-dependent increase in fluorescence by IMP alone, leading to K_d values of 0.22 ± 0.07 µM (Figure 4c, Table 1). The increase in hTAS1R3-VFT fluorescence upon IMP binding in the absence of L-amino acids suggests a different ligand-dependent conformational change compared to that observed with hTAS1R1-VFT. We investigated the effect of IMP (0.3 µM IMP, final concentration) on the ability of hTAS1R3-VFT to bind L-amino acids. In the presence of IMP, L-Glu and L-Asp bound hTAS1R3-VFT with the same relative order of K_d values (Figure 4d, Table 1). Altogether, our results demonstrate that the VFTs of both hTAS1R1 and hTAS1R3 are able to bind umami compounds at physiologically relevant concentrations.

The 5'-ribonucleotide IMP is able to synergize with some sweet-tasting compounds

We therefore reasoned that IMP might affect human sweet taste receptor activity (TAS1R2/TAS1R3). To do this, we functionally expressed the hTAS1R2/hTAS1R3 receptor in HEK293T cells stably expressing the chimeric G-protein Gα16-gust44 and monitored its activation using calcium imaging. It has been shown that neotame binds hTAS1R2-VFT (Xu *et al.* 2004), while sucralose interacts with the VFTs of both hTAS1R2 and hTAS1R3 subunits (Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005). We recorded concentration-response curves for these two sweeteners in the presence of different concentrations of IMP (0.1 and 10 mM). We found that the activity of hTAS1R2/hTAS1R3 can be enhanced by IMP, leading to decreased half-maximal response (EC_{50}) values (Figure 5a, b, Table 2). Intriguingly, the strongest effect was found for the smallest IMP concentration. Interestingly, the 5'-ribonucleotide guanosine-5'-monophosphate (GMP) did not enhance the sweet taste receptor activity for neotame, whereas stimulation in the presence of 10 mM GMP led to a decrease in the EC_{50} value for sucralose (Supplemental Figure S6). We also tested the two sweeteners cyclamate and NHDC, which interact with the 7TM of hTAS1R3 (Jiang *et al.* 2005b, Winnig *et al.* 2007). Cyclamate and NHDC have also been shown to synergize with sucrose and numerous sweeteners (Fujiwara *et al.* 2012). As shown in Figure 5, in the presence of 10 mM IMP, the EC_{50} values were reduced (Figure 5d, e, Table 1). In contrast, the TAS1R2/TAS1R3 receptor responses induced by the sweetener perillartine, which binds the 7TM of TAS1R2, were not significantly affected by the presence of IMP (Figure 5c; Table 1). These observations suggest that the hTAS1R3 subunit is important for the enhancing activity of IMP. We also tested the L-amino acid L-Glu for its capacity to modulate the sweet taste receptor response to sucralose and neotame. As previously reported for sucrose (Shim *et al.* 2015), the presence of 10 mM L-Glu caused a moderate inhibition of sweetener-induced responses for sucralose (Supplemental Figure S7).

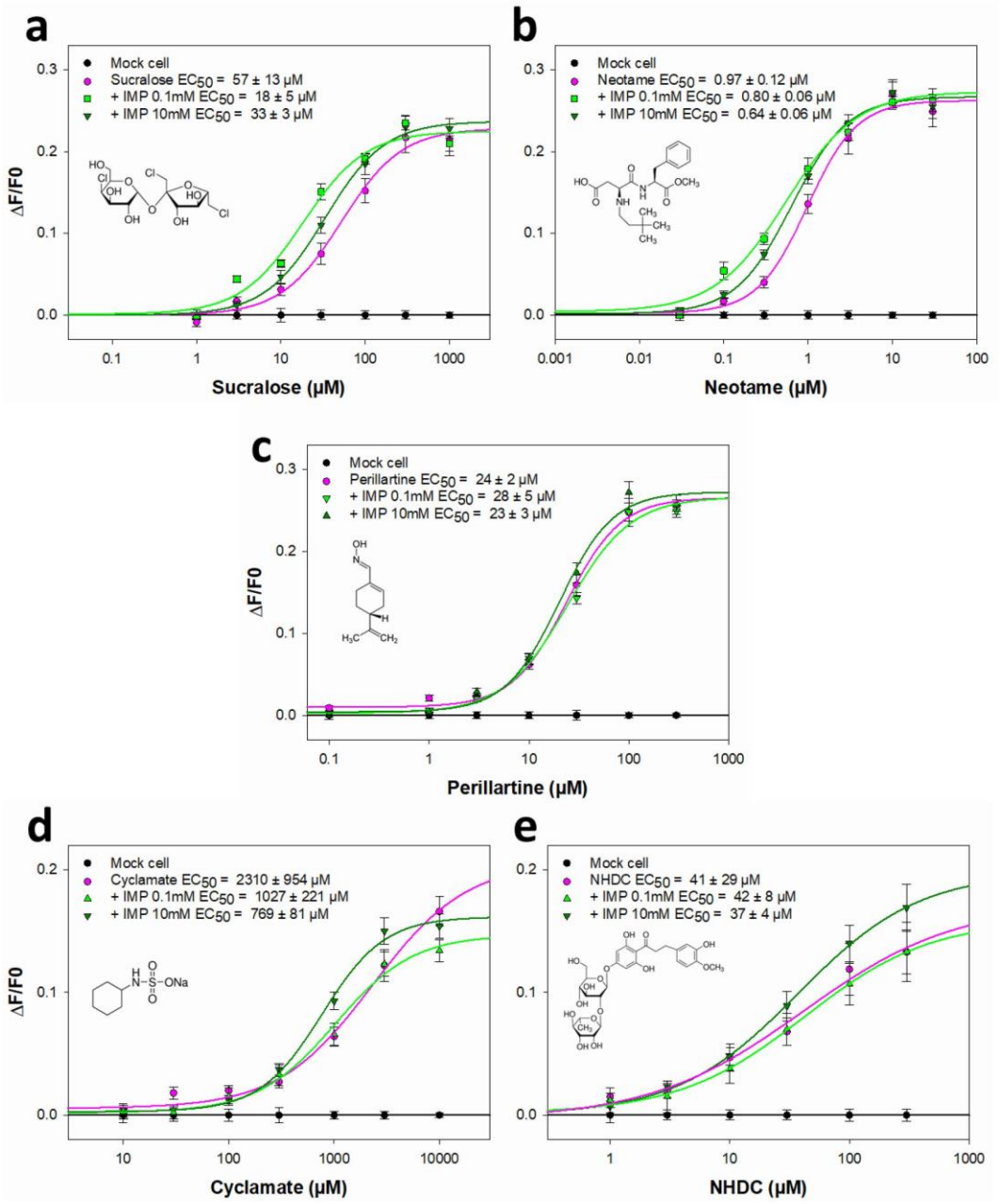

Figure 5. Dose-dependent responses of hTAS1R2/hTAS1R3 to various sweet compounds in the absence and presence of IMP. HEK293T-Gα16gust44 cells expressing hTAS1R2/hTAS1R3 were challenged with sweet compounds alone (pink line) or the sweet compounds in the presence of 0.1 mM IMP (light green line) or 10 mM IMP (dark green line). The cells were assayed for intracellular calcium increase using Fluo-4. The data were fitted with sigmoid dose-response curves, and the EC50 values were calculated using SigmaPlot software. The results are shown as the mean ± SEM of at least three independent experiments.

	Stimuli (No IMP)	+ 0.1mM IMP	+ 10mM IMP
Sucralose	57 ± 13 µM	18 ± 5 µM	33 ± 3 µM
Neotame	0.97 ± 0.12 µM	0.80 ± 0.06 µM	0.64 ± 0.06 µM
Perillartine	24 ± 2 µM	28 ± 5 µM	23 ± 3 µM
Cyclamate	2310 ± 954 µM	1027 ± 221 µM	769 ± 81 µM
NHDC	41 ± 29 µM	42 ± 8 µM	37 ± 4 µM

Table 2. EC50 values of cells expressing hTAS1R2/hTAS1R3 stimulated by various sweet compounds in the absence or presence of 0.1 mM or 10 mM IMP.

The enhancement effect caused by IMP is dependent on the TAS1R3 subunit

The hTAS1R3 subunit when expressed alone did not respond to umami stimuli or to sweeteners. However, hTAS1R3 probably acts as a hTAS1R3/ hTAS1R3 homodimer and is activated by calcium ions when transfected into HEK293-Gα16gust44 cells, and this response is inhibited by lactisole (Tordoff *et al.* 2012). We measured the concentration-response curves of hTAS1R3 for calcium in the presence and absence of IMP. In the presence of 10 mM IMP, the amplitude of the maximum calcium-induced response of hTAS1R3 was reduced to approximately 41% but led to comparable EC_{50} values (Figure 6a, Table 3). This observation demonstrates that the hTAS1R3 subunit is responsible for sweet taste receptor modulation by IMP. We also tested the ability of the heterodimeric hTAS1R2/hTAS1R3 receptor to detect calcium ions. As shown in Figure 6b, we found that cells co-expressing hTAS1R2 and hTAS1R3 subunits responded to calcium in a dose-dependent manner, leading to a lower EC_{50} value than that observed for the hTAS1R3 subunit alone. In the presence of 10 mM IMP, the EC_{50} values for calcium were not altered, but the signal amplitude of hTAS1R2/hTAS1R3 was decreased up to 45% (Figure 6b, Table 3). Interestingly, we found that the response of calcium was similarly inhibited by 10 mM cyclamate (Figure 6).

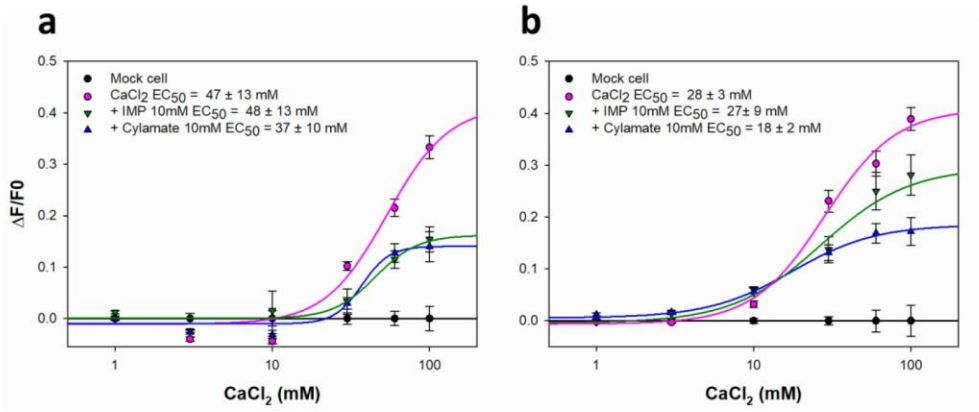

Figure 6. IMP and cyclamate act as non-competitive agonists for CaCl2 on both the sweet-taste hTAS1R2/hTAS1R3 receptor and hTAS1R3 alone. For intracellular calcium recording, hTAS1R3 was stably expressed in HEK293T-Gα16gust44 cells (**a**) without hTAS1R2 or (**b**) with hTAS1R2 transiently transfected and challenged with CaCl2 alone (pink line) or in the presence of 10 mM IMP (green line) or 10 mM cyclamate. Changes in fluorescence after CaCl2 application were monitored and plotted on the y-axes. (ΔF/F) was calculated and fitted with sigmoidal regression with SigmaPlot software.

	$CaCl_2$	+ 10mM IMP	+ 10mM cyclamate
hTAS1R3	47 ± 13 mM	48 ± 13 mM	37 ± 10 mM
hTAS1R2/hTAS1R3	28 ± 3 mM	27 ± 9 mM	18 ± 2 mM

Table 3. EC50 values of cells expressing hTAS1R3 and both hTAS1R2/hTAS1R3 stimulated by CaCl2 in the absence or presence of 10 mM IMP or 10 mM cyclamate.

Discussion

Here we showed that hTAS1R1- and hTAS1R3-VFT can be expressed in *E. coli* as soluble, refolded and functional proteins. Using intrinsic tryptophan fluorescence, we measured their ability to bind the two umami amino acids L-Glu, L-Asp and the 5'-ribonucleotide IMP. We found that hTAS1R1-VFT binds L-Glu and L-Asp with distinct affinities in the micromolar range, in agreement with their respective umami potencies (Kawai *et al.* 2002). These K_d values are lower than the predicted values deduced from the sensory analysis of cellular-based assays (Li *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2002, Toda *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2008), as previously observed for cat TAS1R1-VFT and human and mouse TAS1R2-VFTs (Belloir *et al.* 2017b, Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005). Our data provide evidence that hTAS1R1-VFT binds IMP in the absence of L-amino acids with a high affinity (K_d value of 0.06 ± 0.02 µM), inducing a decrease in intrinsic fluorescence, suggesting a different ligand-induced conformational change compared to the L-Glu and L-Asp response. In contrast with previous observations with cat TAS1R1-VFT, we did not observe a synergistic effect of IMP on the binding of these amino acids to hTAS1R1-VFT. Importantly, we found that hTAS1R3-VFT binds the two umami amino acids, L-Glu and L-Asp, with lower affinities compared to those measured on hTAS1R1-VFT (Table 1). This observation indicates that the VFT of TAS1R3 binds umami stimuli and may contribute to umami receptor activation. Additionally, we showed that VFT of TAS1R3 binds IMP. Since the hTAS1R3 is the common subunit shared by the sweet and umami taste receptors, we hypothesize that some umami amino acids, such as L-Glu and L-Asp or IMP, may potentiate the sweetener-induced response of the TAS1R2/TAS1R3 receptor.

To test this hypothesis, we performed functional expression of the full-length heterodimeric sweet taste TAS1R2/TAS1R3 receptor using HEK293-derived cells. First, we investigated the modulation of TAS1R2/TAS1R3 by IMP stimulated by sucralose and neotame. Sucralose and neotame are high-intensity sweeteners for which the binding sites have been identified in the VFT domains (DuBois and Prakash 2012, Masuda *et al.* 2012, Xu *et al.* 2004). Sucralose is able to bind the two VFTs of the hTAS1R2 and hTAS1R3 subunits, whereas neotame interacts only with TAS1R2-VFT (Xu *et al.* 2004). Cyclamate binds the 7TM of the hTAS1R3 subunit and consequently activates the sweet taste receptor TAS1R2/TAS1R3 with an EC_{50} value of 2.2 mM (Jiang *et al.* 2005a, Jiang *et al.* 2005b, Nakagita *et al.* 2019, Nelson *et al.* 2001, Winnig *et al.* 2007). Cyclamate use in blends of sucrose also acts as a positive allosteric modulator and induces a

synergistic effect on sweet taste sensation (Schiffman *et al.* 1995, Schiffman *et al.* 2000, Schiffman *et al.* 2003). First, our data confirm the synergistic effect of cyclamate (10 mM) on sucralose (Supplemental Figure S8). In mixture with sucralose, cyclamate enhanced the potency of both ligands, leading to decreases in the EC_{50} values of approximately 6-fold. Likewise, 0.1 mM IMP enhanced sucralose and neotame potency, albeit to a much lower extent (decrease in EC_{50} values of 3-fold and 1.2-fold, respectively) than what was observed with cyclamate. The lower effect on neotame could be explained by the fact that neotame binds only to TAS1R2-VFT, whereas sucralose binds the VFTs of both subunits (Jiang *et al.* 2005a, Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005, Xu *et al.* 2004). In contrast, a higher concentration of IMP is needed to potentiate the receptor response to cyclamate and to NHDC, which also binds the 7TM of hTAS1R3 (Winnig *et al.* 2007).

We also tested the intense sweetener perillartine, whose binding site has been identified in the 7TM of hTAS1R2 (Cai *et al.* 2016). Conversely, our data demonstrated that 10 mM IMP had no effect on the hTAS1R2/hTAS1R3 receptor response to perillartine (Figure 5c). Finally, we measured the capacity of IMP to synergize with calcium, which has been shown to activate the subunit TAS1R3 in the absence of TAS1R2. IMP potentiated the response of the heterodimeric receptor and the monomeric TAS1R3. We can speculate that calcium does not share the same binding site as IMP. In addition, this binding site is probably not located in the 7TM of TAS1R3. Surprisingly, we found that calcium ions are able to activate the heterodimeric hTAS1R2/hTAS1R3 receptor, as previously reported for hTAS1R3 expressed in the absence of hTAS1R2 (Tordoff *et al.* 2012). The activation of the heterodimeric sweet taste receptor raises the question of why calcium is not perceived as sweet. We found that IMP and cyclamate act as non-competitive agonists regarding calcium binding affinity by decreasing their efficacy in the presence of TAS1R2/TAS1R3 and TAS1R3 receptors without any change in potency. Taken together, our data confirm the contribution of the TAS1R3 subunit in the mechanism of the synergy of IMP with the sweeteners that bind hTAS1R2-VFT, hTAS1R3-VFT or both, acting through TAS1R3. Combining our biochemical results and cellular assay data, we conclude that IMP enhances sweetener potency through its interaction with TAS1R3-VFT and could also be classified as a PAM for sweet taste.

Some previous studies demonstrated the major contribution of TAS1R1 subunits regarding umami ligand interactions and IMP synergism acting through TAS1R1-VFT (Li *et al.* 2002, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2008). In some of them, their data failed to show the IMP (2.5 mM) response of human TAS1R2/TAS1R3 to sweet-taste stimuli such as sucrose (100 mM), aspartame (1.5 mM) and saccharin (0.4 mM) (Li *et al.* 2002), probably because they only tested one too-high sweet concentration near EC_{100} instead of doing a dose-response curve and used the lowest concentration of IMP. Interestingly, the sweet-umami chimeric receptor, which combines TAS1R2-ECD linked to TAS1R1-7TM with the TAS1R3 subunit, recognizes sucrose and aspartame but not cyclamate (Zhang *et al.* 2008). However, the authors showed that cyclamate, instead of activating the sweet-umami chimeric receptor TAS1R2-1/TAS1R3, acts as an enhancer for sucralose and aspartame because of differences in the energy barrier of activation of these chimeric receptors. Surprisingly, these authors show that IMP cannot enhance the activity of sucralose or aspartame on TAS1R2-1/TAS1R3. These results go against our observation that IMP can enhance the activity of sucralose and neotame on the wild-type sweet receptor and suggest that TAS1R2-7TM could also play a role in the activation by IMP (Zhang *et al.* 2008).

Over the years, many studies have focussed on finding allosteric modulators of GPCRs in general and on sweet and umami receptors in particular (Gentry *et al.* 2015). Some PAMs have been well identified and characterized for sweet taste receptors such as SE-1, SE-2 and their derivatives (Senomyx) that bind TAS1R2-VFT: S-819 acts through TAS1R2-7TM, while cyclamate and NHDC interact with TAS1R3-7TM (Servant *et al.* 2011, Servant *et al.* 2010). Synergisms have also been found in binary mixtures with sweeteners interacting with different binding sites on the TAS1R2 and TAS1R3 subunits (Fujiwara *et al.* 2012). Purinic ribonucleotides, such as IMP and GMP, can strongly potentiate umami receptor activity with L-glutamate (Zhang *et al.* 2008). Many studies have been conducted to identify novel umami and umami-enhancing compounds that are based on extracts from fish, chicken, or peanut hydrolysate or that are produced during food fermentation (Kong *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2016). They revealed that some peptides generate umami taste and can produce synergistic effects on taste and enhance the flavour of aromatic substances (Nishimura *et al.* 2016). Recently, molecular docking combined with electronic tongues was used to investigate the synergistic effect between umami peptides, MSG and hTAS1R1/hTAS1R3, opening the way for new screening approaches to understand interactions of tasting compounds (Dang *et al.* 2019a, Dang *et al.* 2019b). Surprisingly, the set of natural molecules with umami effects on TAS1R1/TAS1R3 has widened with the discovery of natural compounds such as N-cinnamoyl derivatives (Backes *et al.* 2015). Two of these amine derivatives, rubemamine and rubescenamine, elicit umami taste and modulate the activation of umami receptors to MSG and even positively enhance IMP's synergistic effect on MSG. Along the same lines, Toda and collaborators demonstrated that methional, a familiar flavour compound naturally present in foods such as tomatoes, cheese and soy sauce, could positively or negatively modulate the TAS1R1/T1SR3 receptor through the contribution of the 7TM of TAS1R1 (Toda *et al.* 2018). However, few studies have been interested in the interaction between umami compounds and sweet taste receptors at the molecular level. Shim et al. investigated the interaction of MSG and glutamyl dipeptides on sweet receptors and showed that umami might inhibit agonist binding to TAS1R2 in an allosteric manner (Shim *et al.* 2015).

We suggest that a mechanism of inter-subunit and intra-subunit rearrangement could account for these results. We propose that IMP induces different conformational changes. First, IMP binding to TAS1R3-VFT induces conformation changes in the VFT, and the reorientation of the VFT domain could in turn lead to intra-subunit movement between TAS1R3-VFT and TAS1R3-7TM due to the rigidity of the CRD (Huang *et al.* 2011, Koehl *et al.* 2019, Muto *et al.* 2007). Thus, IMP could act as a cyclamate enhancer through rearrangement between TAS1R3-and TAS1R2-7TM when the sweet tasting compound binds the VFT. The coupling cannot occur when 7TM is replaced by TAS1R1-7TM instead of TAS1R2-7TM in the TAS1R2 subunit, maybe because of the energy barrier, as suggested before (Zhang *et al.* 2008), or because TAS1R2-7TM still plays a role in the activation process. Second, IMP binding to TAS1R3-VFT could create inter-subunit rearrangement by allosteric interaction between the two VFT domains. Thus, displacement of the VFT domain equilibrium would enhance TAS1R2/TAS1R3 activation by sweet-tasting ligands.

These arguments are supported by many studies on CaSR, mGlu and $GABA_B$ receptors that have elucidated the mechanism of the functional interaction between each subunit and G proteins (Jacobsen *et al.* 2017, Koehl *et al.* 2019, Liu *et al.* 2017, Moller *et al.* 2017, Pin *et al.* 2019). It has been shown for the mGlu

dimeric receptor that glutamate binding to one VFT domain leads to receptor activation and facilitates the occupancy of the other VFT, inducing the full activity of the mGlu receptor (Kniazeff *et al.* 2004, Suzuki *et al.* 2004). Similarly, the heterodimeric cooperative phenomenon has been observed for $GABA_B$, whose agonist affinity towards $GABA_{B1}$ is enhanced by its interaction with the VFT of $GABA_{B2}$ (Geng *et al.* 2013). This mechanism is also confirmed for the CaSR dimer, showing that a single allosteric site is sufficient for obtaining PAM activity (Jacobsen *et al.* 2017). The TAS1Rs assemble to form heterodimers, TAS1R1/TAS1R3 for umami receptor and TAS1R2/TAS1R3 for sweet taste receptor (Li *et al.* 2002, Xu *et al.* 2004), and TAS1R3 in homomeric form is able to respond to high concentrations of sucrose (Nelson *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2003). Several studies indicate that the dimeric structure is essential for the conformational transitions to G protein activation (El Moustaine *et al.* 2012, Pin and Bettler 2016). It is not yet clear which 7TM between TAS1R1, T1S1R2 and TAS1R3 is responsible for coupling to G proteins in sweet and umami receptors. Research carried out on the mGlu2-4 heterodimer indicates that mGlu4-7TM is responsible for G protein activation, even if mGlu2 in the homodimer form can also activate G protein (Liu *et al.* 2017). Nevertheless, the TAS1R2 and TAS1R3 subunits can activate signal transduction in cell-based assays by themselves with specific ligands, suggesting that G protein activation could be mediated by each subunit for homodimer receptors, while in a heterodimer, the allosteric interaction leads only one 7TM to activate the G protein. Therefore, interaction between VFTs could promote activation of both 7TM domains in a symmetric or asymmetric way, as described for mGlu receptors (Koehl *et al.* 2019, Liu *et al.* 2017). More data will be needed to understand the multiple allosteric interactions and cooperativity between each VFT, CRD and 7TM domain in TAS1Rs. To achieve this goal, allosteric modulators and ligands well defined and characterized for their binding sites would be helpful.

In conclusion, we have shown that IMP is able to bind TAS1R1-VFT and, surprisingly, TAS1R3-VFT subunits, forming umami receptors. This interaction takes place in the micromolar range and induces a conformational change of the VFT. In addition, a cell receptor assay showed that IMP potentiates the human TAS1R2/TAS1R3 receptor response to sweeteners, such as sucralose and neotame. Thus, IMP and maybe other umami compounds, in cooperation with sweet-tasting compounds, contribute to enhancing the sweetness of sweetener blends used as food additives. Additional studies using site-directed mutagenesis and molecular modelling are needed to identify the amino acid residues of hTAS1R3-VFT involved in the binding of IMP and in the receptor allostery. These findings suggest more complex interactions at the receptor level between umami and sweet taste qualities and open the field to the development of new enhancers for sweetness.

Material and Methods

Construction of the expression plasmid for *E. coli* expression and overexpression of recombinant TAS1R proteins.

The cDNA encoding hTAS1R1-VFT (accession number NM_138697), hTAS1R2-VFT (accession number NM_152232), or hTAS1R3-VFT (accession number NM_152228) minus a putative signal sequence and the CRD was amplified by PCR from the full-length human taste receptor subunit (Raliou *et al.* 2011)

and subcloned into the *Nde*I and *Eco*RI restriction sites of the pET28a expression vector (Novagen). For each construction, the forward primer incorporated an *Nde*I sequence. The reverse primer incorporated an *Eco*RI sequence for cloning purposes, as well as a sequence coding for a His-tag for TAS1R1-VFT and TAS1R2-VFT construction and a sequence coding for a Strep-tag II for TAS1R3-VFT. The final expression vectors pET28-hTAS1R1-VFT and pET28-hTAS1R2-VFT encoded a fusion protein comprising an N-terminal His_6-tag that could be cleaved by thrombin, followed by hTAS1R1-VFT (Phe21-Ser495) or hTAS1R2-VFT (Ala22-Ser493) and a second His_6-tag. pET28-hTAS1R3-VFT encodes an N-terminal His_6-tag followed by hTAS1R3-VFT (Ala21-Ser497) and the Strep-tag II. The final constructs were checked by DNA sequencing (Genewiz) and were used for all subsequent studies with *E. coli*.

Overexpression of TAS1R-VFTs was carried out by inducing *E. coli* strain BL21(DE3) grown on 2xYT medium (16 g/L tryptone, 10 $g \cdot L^{-1}$ yeast extract and 5 $g \cdot L^{-1}$ NaCl, pH 7.5) containing 45 $\mu g \cdot mL^{-1}$ kanamycin at 37°C to an optical density of 0.7 at 600 nm. Protein expression was induced for 3 hours by the addition of 1 mM isopropyl-ß,D-thiogalactopyranoside (ITPG). The culture was harvested by centrifugation (4500 g for 15 minutes at 4°C). The cell pellet was stored at -80°C until further use. The overexpression of hTAS1Rs-VFT was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis.

Inclusion body purification

Purification of inclusion bodies (IB) was carried out using detergent buffer, Triton buffer and a final urea wash protocol. Cells from 1 L of culture were resuspended in 20 mL of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.2% Tween 20, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM PMSF) and disrupted by sonication (Vibra Cell, Sonics & Materials) for 3 minutes. DNase I (10 µg/mL) and lysozyme (0.2 mg/mL) were added, and the cell suspension was incubated for 30 minutes at 600 rpm at 37°C with a thermomixer. The lysed cell suspension was sonicated and centrifuged for 15 minutes at 10,000 g at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet, which contained IB, was washed with 10 mL of high salt buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA), sonicated for 2 minutes and centrifuged for 10 minutes at 10,000 g at 4°C. Then, two washes with urea buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 4 M urea) were processed. Finally, the pellet was resuspended in Triton buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA), aliquoted by 1 mL in a microtube, and centrifuged for 20 minutes at 10,000 g at 4°C. The supernatant was discarded, and the final pellet was dried and stored at -80°C until use.

Solubilization of inclusion bodies and refolding of recombinant hTAS1Rs-VFT

Inclusion bodies were solubilized using high concentrations of urea as a chaotropic agent, in the presence of SDS and n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) (Anatrace). The dried pellet was mixed with lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.6% SDS, 8 M urea, 25 mM DTT and 0.1 mM DDM) and disrupted by high-speed shaking with a tissue lyser (Qiagen) for 3 minutes with carbon beads introduced into the microtube, followed by 2 hours of agitation at 600 rpm at 50°C with a thermomixer. The non-solubilized fraction was pelleted by centrifugation for 30 minutes at 24,000 g at 20°C. The solubilized fraction (20 mg/mL) was diluted drop by drop in 20 mL lysis buffer and incubated for 1 hour at 50°C in a water bath.

Initiation of refolding started with urea and SDS elimination by dialysis. The solubilized fraction was filtered through 0.45 µM filters and loaded into a dialysis tubing with a suitable molecular cut-off of 12-14 kDa. First, dialysis was produced to reduce the urea concentration (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.6% SDS, 1 M urea, 1 mM DTT and 0.1 mM DDM). After 2 hours, the dialysis tubing was transferred to a buffer without urea and with a low level of SDS (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.06% SDS, 1 mM DTT and 0.1 mM DDM) for 2 hours at room temperature. Then the dialyzed sample was filtered (0.22 µM) and transferred to an Erlenmeyer flask with a magnet stirrer. The DDM concentration was adjusted to reach 5 mM, followed by SDS precipitation by successive addition of NaCl (300 mM) and KCl (300 mM) under vigorous agitation. The white precipitate of SDS was eliminated by centrifugation at 48,400 g for 45 minutes at 15°C. The resulting supernatant was filtered (0.22 µM) and dialysed two times under a dialysis tubing cut-off of 50 kDa against dialysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1 mM DTT and 0.1 mM DDM) for 2 hours and then overnight.

Purification of TAS1R-VFTs

The last step of refolding was achieved by a nickel affinity purification step. The dialyzed sample was loaded onto a 1 mL His-trap HP column (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) in closed circuit for 24 hours, allowing isolation of denatured protein. The fraction not retained by the IMAC step was concentrated to approximately 2 mL using a preparative scale concentrator (Vivaspin, Sartorius, Aubagne, France) with a molecular weight cut-off of 30 kDa. A final polishing step was performed by SEC to separate the monomeric receptor and higher-molecular-weight forms of the receptor. A Superdex 200 10/300GL column with an Akta Pure FPLC system (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) was used. The column was first equilibrated with at least 2 column volumes of wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1 mM DDM). The concentrated protein sample was loaded on the column and washed using wash buffer at 0.5 mL/minutes. Protein elution was monitored with UV absorbance at 280 nm, and fractions were automatically collected. Peak fractions were pooled and analysed by Western blotting. A calibration to correlate the elution volume with the molecular mass was performed with a standard mixture.

TAS1R-VFT characterization

Western blot analysis. Receptor detection and purity analysis were followed by SDS-PAGE (Bio-Rad) using Coomassie staining and Western blot analysis. For blotting, the gel-resolved samples were transferred to PVDF membranes, blocked in skim milk (5% w/v non-fat dried milk in TBST) for 1 hour, and incubated with a His primary antibody (1: 2000 in TBST) overnight at 4°C. The His-tagged proteins were then detected with a goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody (Bio-Rad) (1:25,000 in TBST, 1 hour, room temperature) and visualized using Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad). All images were captured using the ChemiDoc system and Image Lab software (Bio-Rad) to analyse band migrations, intensities and purity.

SEC-MALS analysis. The oligomeric state of the purified TAS1Rs-VFT proteins was analysed by SEC coupled with multi-angle laser light scattering (SEC-MALS) using an HPLC system (Jasco PU-2080 Plus system consisting of a pump, a vacuum degasser and an autosampler) and a Silica Gel KW803 column (Shodex, Munich, Germany). Detection was performed using a triple-angle light scattering detector (Mini-DAWN™ TREOS, Wyatt Technology), a refractometer (Ri-4030 Refractive Index Detector, Jasco) and a UV detector (UV-4070 UV/Vis Detector, Jasco) at 280 nm. Molecular weight determination was performed using

ASTRA software (Wyatt Technology) using a dn/dc value of 0.185 ml/g for analysis. The SEC-MALS system was calibrated with bovine serum albumin prior to TAS1R-VFT protein. The gel filtration-purified fraction was loaded onto a pre-equilibrated column with wash buffer as previously described. An aliquot of 100 µl of purified TAS1R-VFT fractions at a concentration of 1.2 mg/ml was injected with a flow rate of 0.5 ml/minute.

Circular dichroism analysis. Far-UV circular dichroism (CD) spectra were measured over 180 nm-260 nm with a CD spectropolarimeter (Jasco J-815) equipped with a Peltier temperature control. Measurements were made at 20°C in a quartz cuvette with a path length of 0.01 cm, a step size of 0.5 nm, a scan speed of 50 nm/minute and a response time of 1 second. The data were averaged over 10 accumulated scans. The spectra were smoothed using the Stavitzky-Golay convolution filter with a span of 5. They were corrected for buffer contribution and converted to mean residue ellipticity in $deg \cdot cm^2 \cdot dmol^{-1}$. The secondary structure proportions were estimated using the deconvolution K2D algorithm on the DichroWeb program (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml).

Ligand binding analysis using intrinsic fluorescence

The intrinsic fluorescence of hTAS1Rs-VFT was carried out using a Cary Eclipse spectrofluorometer (Varian Instruments) equipped with a Peltier temperature control unit. Sample proteins were excited at 295 nm, and emission spectra were recorded between 300 and 400 nm, with a 5-nm slit width for emission and excitation. For titration experiments, fluorescence spectra were recorded using 0.25 µM protein solution in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and 0.1 mM DDM. Ligand solutions were freshly prepared in the same buffer. Successive aliquots of potential ligands were added to 400 µL of hTAS1Rs-VFT solution. The temperature was kept constant at 20°C. Fluorescence measurements were corrected for dilution, bleaching and nonspecific buffer quenching. K_d values and standard errors were calculated from a plot of the ratio between the fluorescence intensity variation and the maximum of fluorescence intensity variation versus concentration of total ligand, obtained with a standard non-linear regression method and using a one-site saturation ligand binding equation within SigmaPlot software. To measure the synergism between L-amino acids or sweet compounds and IMP, the fluorescence intensities of hTAS1R-VFTs were normalized to 0% in the presence of 0.3 µM IMP alone and 100% at the highest concentrations of L-amino acids in the absence of IMP. The K_d values of ligand-receptor interactions were determined using the equation $\Delta F/\Delta F_{max} = B_{max}[L]/(K_d+[L])$, where K_d is the apparent dissociation constant, ΔF is the difference between the fluorescence intensity at a given concentration of ligand and the fluorescence intensity in the absence of ligand, ΔF_{max} is the difference at infinite ligand concentration [L], B_{max} is the maximum fluorescence signal, and [L] corresponds to the concentration of ligands. The reported K_d values are the average of six measurements performed on at least three independently refolded protein samples. All compounds were obtained from Sigma-Aldrich. Statistical analyses: Dunnett's test was used to determine the statistical significance between data means.

Construction of the expression plasmid for functional expression of TAS1R proteins in HEK293 cells stably expressing gustducin.

Chimeric Gα16gust44 mutant protein was generated by replacing the C-terminus of Gα16 with the C-terminal 44 residues of Gα-gustducin (Raliou *et al.* 2011). The synthetic cDNA optimized for human TAS1R2

and TAS1R3 expression was cloned into the pcDNA6-myc-HisA and pcDNA4-myc-HisA vectors, generating the pcDNA6-hTAS1R2 and pcDNA4-hTAS1R3 plasmids, respectively (Genewiz).

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% dialysed FBS, 1% P/S at 37°C and 7.3% CO_2 in a humidified atmosphere. The stable HEK293T-Gα16gust44 cells were constructed by stable transfection of pcDNA3.1/Hygro-Gα16gust44 plasmid into HEK293T cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 48 hours, the cells were selected with 400 $\mu g \cdot ml^{-1}$ hygromycin for 2-3 weeks. Thirty individual hygromycin-resistant colonies were expanded and screened for functional expression after transient co-transfection with pcDNA6-TAS1R2 and pcDNA4-TAS1R3 and measurement of calcium responses to sucralose. In the same way, clone selection was done under zeocin selection (250 µg/ml) to generate a stable HEK293T-Gα16gust44-hTAS1R3 cell line for further calcium mobilization assays.

Calcium mobilization assays

Forty-eight hours before the assay, HEK293T-Gα16gust44 or HEK293T-Gα16gust44-hTAS1R3 cells were plated (4 x 10^4 cells/well) on poly-D-lysine-coated 96-well plates. Twenty-four hours later, cells were transiently transfected with pcDNA6-hTAS1R2 and pcDNA4-hTAS1R3 with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. As a negative control, HEK293T cells were mock-transfected with the empty expression vector. Twenty-four hours after transfection, the cells were loaded with the calcium indicator Fluo-4 AM (2.5 µM, Molecular Probes) dissolved in pluronic acid (0.025%, w/v) in the presence of 2.5 mM probenecid for 1 hour at 37°C. After washing with C1 buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.4, 2 mM $CaCl_2$), the 96-well plates containing the cells were transfected into an automated fluorimetric FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader and subjected to stimuli. The fluorescence intensity was measured for 90 seconds after the addition of the compounds. A range of concentrations from 3 µM to 3 mM for sucralose, 0.1 to 100 µM for neotame and 0.1 to 1000 µM for perillartine were tested with or without IMP 0.1 or 10 mM or cyclamate 10 mM. All concentration-receptor combinations were measured in triplicate, and each experiment was repeated at least 4 times. The Ca^{2+} changes are expressed as fractional changes in fluorescence light intensity: $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$, where F is the fluorescence light intensity at each point and F_0 is the value of emitted fluorescent light before the stimulus application. For the calculation of dose-response relationships, the changes in fluorescence upon stimulus application were averaged, mock-subtracted and baseline-corrected. The resulting dose-response data were fitted using a four-parameter logistic equation. The half-maximal effective concentrations (EC_{50} values) were calculated using SigmaPlot software.

References

Backes, M., Obst, K., Bojahr, J., Thorhauer, A., Roudnitzky, N., Paetz, S., Reichelt, K. V., Krammer, G. E., Meyerhof, W. and Ley, J. P. (2015) Rubemamine and Rubescenamine, Two Naturally Occurring N-Cinnamoyl Phenethylamines with Umami-Taste-Modulating Properties. *J Agric Food Chem, 63*(39), pp. 8694-704.

Behrens, M., Meyerhof, W., Hellfritsch, C. and Hofmann, T. (2011) Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl, 50*(10), pp. 2220-42.

Belloir, C., Neiers, F. and Briand, L. (2017a) Sweeteners and sweetness enhancers. *PLoS One, 20*(4), pp. 279-285.
Belloir, C., Savistchenko, J., Neiers, F., Taylor, A. J., McGrane, S. and Briand, L. (2017b) Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli. *PLoS One, 12*(10), pp. e0187051.
Brauner-Osborne, H., Wellendorph, P. and Jensen, A. A. (2007) Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Curr Drug Targets, 8*(1), pp. 169-84.
Cai, C., Jiang, H., Li, L., Liu, T., Song, X. and Liu, B. (2016) Characterization of the Sweet Taste Receptor Tas1r2 from an Old World Monkey Species Rhesus Monkey and Species-Dependent Activation of the Monomeric Receptor by an Intense Sweetener Perillartine. *PLoS One, 11*(8), pp. e0160079.
Cheron, J. B., Soohoo, A., Wang, Y., Golebiowski, J., Antonczak, S., Jiang, P. and Fiorucci, S. (2019) Conserved Residues Control the T1R3-Specific Allosteric Signaling Pathway of the Mammalian Sweet-Taste Receptor. *Chem Senses, 44*(5), pp. 303-310.
Dang, Y., Hao, L., Cao, J., Sun, Y., Zeng, X., Wu, Z. and Pan, D. (2019a) Molecular docking and simulation of the synergistic effect between umami peptides, monosodium glutamate and taste receptor T1R1/T1R3. *Food Chem, 271*, pp. 697-706.
Dang, Y., Hao, L., Zhou, T., Cao, J., Sun, Y. and Pan, D. (2019b) Establishment of new assessment method for the synergistic effect between umami peptides and monosodium glutamate using electronic tongue. *Food Res Int, 121*, pp. 20-27.
DuBois, G. E. and Prakash, I. (2012) Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annu Rev Food Sci Technol, 3*, pp. 353-80.
El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Baneres, J. L., Rondard, P. and Pin, J. P. (2012) Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109*(40), pp. 16342-7.
Fujiwara, S., Imada, T., Nakagita, T., Okada, S., Nammoku, T., Abe, K. and Misaka, T. (2012) Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chemistry, 130*(3), pp. 561-568.
Galindo-Cuspinera, V. and Breslin, P. A. (2006) The liaison of sweet and savory. *Chem Senses, 31*(3), pp. 221-5.
Geng, Y., Bush, M., Mosyak, L., Wang, F. and Fan, Q. R. (2013) Structural mechanism of ligand activation in human GABA(B) receptor. *Nature, 504*(7479), pp. 254-259.
Gentry, P. R., Sexton, P. M. and Christopoulos, A. (2015) Novel Allosteric Modulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem, 290*(32), pp. 19478-88.
Huang, S., Cao, J., Jiang, M., Labesse, G., Liu, J., Pin, J. P. and Rondard, P. (2011) Interdomain movements in metabotropic glutamate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(37), pp. 15480-5.
Huang, Y., Zhou, Y., Castiblanco, A., Yang, W., Brown, E. M. and Yang, J. J. (2009) Multiple Ca2+-Binding Sites in the Extracellular Domain of the Ca2+-Sensing Receptor Corresponding to Cooperative Ca2+ Response. *Biochemistry, 48*(2), pp. 388-398.
Jacobsen, S. E., Gether, U. and Brauner-Osborne, H. (2017) Investigating the molecular mechanism of positive and negative allosteric modulators in the calcium-sensing receptor dimer. *Sci Rep, 7*, pp. 46355.
Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., Margolskee, R. F. and Max, M. (2005a) Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem, 280*(15), pp. 15238-46.
Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., Max, M. and Margolskee, R. F. (2005b) Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J Biol Chem, 280*(40), pp. 34296-305.
Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Margolskee, R. F. and Max, M. (2004) The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem, 279*(43), pp. 45068-75.
Kawai, M., Okiyama, A. and Ueda, Y. (2002) Taste enhancements between various amino acids and IMP. *Chem Senses, 27*(8), pp. 739-45.
Kemp, S. E. and Beauchamp, G. K. (1994) Flavor Modification by Sodium Chloride and Monosodium Glutamate. *Journal of Food Science, 59*(3), pp. 682-686.
Kniazeff, J., Bessis, A. S., Maurel, D., Ansanay, H., Prezeau, L. and Pin, J. P. (2004) Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol, 11*(8), pp. 706-13.
Kochem, M. and Breslin, P. A. (2017) Clofibrate inhibits the umami-savory taste of glutamate. *12*(3), pp. e0172534.
Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M. J., Chu, M., Kobilka, T. S., Laeremans, T., Steyaert, J., Tarrasch, J., Dutta, S., Fonseca, R., Weis, W. I., Mathiesen, J. M., Skiniotis, G. and Kobilka, B. K. (2019) Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature, 566*(7742), pp. 79-84.
Kong, Y., Yang, X., Ding, Q., Zhang, Y. Y., Sun, B. G., Chen, H. T. and Sun, Y. (2017) Comparison of non-volatile umami components in chicken soup and chicken enzymatic hydrolysate. *Food Res Int, 102*, pp. 559-566.
Kuninaka, A. (1960) Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. *J Agric Chem Soc Jpn, 34*, pp. 489-492.
Kuninaka, A. (1964) The nucleotides, a rationale of research on flavor potentiation. in *Proceedings of the Symposium on Flavor Potentiation*. pp. 4-9.
Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H. and Morikawa, K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature, 407*(6807), pp. 971-7.
Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(7), pp. 4692-6.

Liu, J., Zhang, Z., Moreno-Delgado, D., Dalton, J. A., Rovira, X., Trapero, A., Goudet, C., Llebaria, A., Giraldo, J., Yuan, Q., Rondard, P., Huang, S., Liu, J. and Pin, J.-P. (2017) Allosteric control of an asymmetric transduction in a G protein-coupled receptor heterodimer. *Elife, 6*, pp. e26985.

Maillet, E. L., Cui, M., Jiang, P., Mezei, M., Hecht, E., Quijada, J., Margolskee, R. F., Osman, R. and Max, M. (2015) Characterization of the Binding Site of Aspartame in the Human Sweet Taste Receptor. *Chem Senses, 40*(8), pp. 577-86.

Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2012) Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. *Protein Expr Purif, 83*(1), pp. 75-83.

Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2013) An efficient Escherichia coli expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered, 4*(1), pp. 25-9.

Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T. and Ishiguro, M. (2012) Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS One, 7*(4), pp. e35380.

Masuda, T., Kigo, S., Mitsumoto, M., Ohta, K., Suzuki, M., Mikami, B., Kitabatake, N. and Tani, F. (2018) Positive Charges on the Surface of Thaumatin Are Crucial for the Multi-Point Interaction with the Sweet Receptor. *Front Mol Biosci, 5*, pp. 10.

Masuda, T., Taguchi, W., Sano, A., Ohta, K., Kitabatake, N. and Tani, F. (2013) Five amino acid residues in cysteine-rich domain of human T1R3 were involved in the response for sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochimie, 95*(7), pp. 1502-5.

McGrane, S., Hernangomez de Alvaro, C., Gibbs, M., Fine, R., Klebansky, B. and Taylor, A. J. (2014) Understanding Cat Umami Flavour Perception Through in vivo and in silico Studies. in *In Current Topics in Flavor Chemistry and Biology. Proc. Conf. 10th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology, 2013, Eisenach, Germany, pp.35-40*.

McGrane, S. and Taylor, A. J. (2014) MARS, I., (ed.),Waltham Centre for Pet Nutrition, GB.

Moller, T. C., Moreno-Delgado, D., Pin, J. P. and Kniazeff, J. (2017) Class C G protein-coupled receptors: reviving old couples with new partners. *Biophys Rep, 3*(4), pp. 57-63.

Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K. and Jingami, H. (2007) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ligand-binding domain of metabotropic glutamate receptor 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 63*(Pt 7), pp. 627-30.

Nakagita, T., Ishida, A., Matsuya, T., Kobayashi, T., Narukawa, M., Hirokawa, T., Hashimoto, M. and Misaka, T. (2019) Structural insights into the differences among lactisole derivatives in inhibitory mechanisms against the human sweet taste receptor. *PLoS One, 14*(3), pp. e0213552.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature, 416*(6877), pp. 199-202.

Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell, 106*(3), pp. 381-90.

Nie, Y., Hobbs, J. R., Vigues, S., Olson, W. J., Conn, G. L. and Munger, S. D. (2006) Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. *Chem Senses, 31*(6), pp. 505-13.

Nie, Y., Vigues, S., Hobbs, J. R., Conn, G. L. and Munger, S. D. (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol, 15*(21), pp. 1948-52.

Nishimura, T., Goto, S., Miura, K., Takakura, Y., Egusa, A. S. and Wakabayashi, H. (2016) Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups. *Food Chem, 196*, pp. 577-83.

Pin, J.-P., Kniazeff, J., Prézeau, L., Liu, J.-F. and Rondard, P. (2019) GPCR interaction as a possible way for allosteric control between receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology, 486*, pp. 89-95.

Pin, J. P. and Bettler, B. (2016) Organization and functions of mGlu and GABAB receptor complexes. *Nature, 540*(7631), pp. 60-68.

Pin, J. P., Galvez, T. and Prezeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther, 98*(3), pp. 325-54.

Raliou, M., Grauso, M., Hoffmann, B., Schlegel-Le-Poupon, C., Nespoulous, C., Debat, H., Belloir, C., Wiencis, A., Sigoillot, M., Bano, S. P., Trotier, D., Pernollet, J. C., Montmayeur, J. P., Faurion, A. and Briand, L. (2011) Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. *Chem Senses, 36*(6), pp. 527-37.

Sato, M. and Akaike, N. (1965) 5'-ribonucleotides as gustatory stimuli in rats electrophysiological studies. *Jpn J Physiol, 15*(1), pp. 53-70.

Schiffman, S. S., Booth, B. J., Carr, B. T., Losee, M. L., Sattely-Miller, E. A. and Graham, B. G. (1995) Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. *Brain Res Bull, 38*(2), pp. 105-20.

Schiffman, S. S., Sattely-Miller, E. A., Graham, B. G., Booth, B. J. and Gibes, K. M. (2000) Synergism among ternary mixtures of fourteen sweeteners. *Chem Senses, 25*(2), pp. 131-40.

Schiffman, S. S., Sattely-Miller, E. A., Graham, B. G., Zervakis, J., Butchko, H. H. and Stargel, W. W. (2003) Effect of repeated presentation on sweetness intensity of binary and ternary mixtures of sweeteners. *Chem Senses, 28*(3), pp. 219-29.

Servant, G., Tachdjian, C., Li, X. and Karanewsky, D. S. (2011) The sweet taste of true synergy: positive allosteric modulation of the human sweet taste receptor. *Trends Pharmacol Sci, 32*(11), pp. 631-6.

Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X. Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., Brust, P., Brune, N., DuBois, G. E., Zoller, M. and Karanewsky, D. S. (2010) Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4746-51.

Shim, J., Son, H. J., Kim, Y., Kim, K. H., Kim, J. T., Moon, H., Kim, M. J., Misaka, T. and Rhyu, M. R. (2015) Modulation of sweet taste by umami compounds via sweet taste receptor subunit hT1R2. *PLoS One, 10*(4), pp. e0124030.

Smith, K. R. and Spector, A. C. (2014) The importance of the presence of a 5'-ribonucleotide and the contribution of the T1R1 + T1R3 heterodimer and an additional low-affinity receptor in the taste detection of L-glutamate as assessed psychophysically. *J Neurosci, 34*(39), pp. 13234-45.

Suzuki, Y., Moriyoshi, E., Tsuchiya, D. and Jingami, H. (2004) Negative Cooperativity of Glutamate Binding in the Dimeric Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1. *Journal of Biological Chemistry, 279*(34), pp. 35526-35534.

Toda, Y., Nakagita, T., Hayakawa, T., Okada, S., Narukawa, M., Imai, H., Ishimaru, Y. and Misaka, T. (2013) Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). *J Biol Chem, 288*(52), pp. 36863-77.

Toda, Y., Nakagita, T., Hirokawa, T., Yamashita, Y., Nakajima, A., Narukawa, M., Ishimaru, Y., Uchida, R. and Misaka, T. (2018) Positive/Negative Allosteric Modulation Switching in an Umami Taste Receptor (T1R1/T1R3) by a Natural Flavor Compound, Methional. *8*(1), pp. 11796.

Tordoff, M. G., Alarcon, L. K., Valmeki, S. and Jiang, P. (2012) T1R3: a human calcium taste receptor. *Sci Rep, 2*, pp. 496.

Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N. A., Slack, J. P. and Meyerhof, W. (2007) The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol, 7*, pp. 66.

Winnig, M., Bufe, B. and Meyerhof, W. (2005) Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neurosci, 6*, pp. 22.

Woskow, M. H. (1969) Selectivity in flavor modification by 5'-ribonucleotide. *Food Technology, 23*.

Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M. and Li, X. (2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(39), pp. 14258-63.

Yamaguchi, S. (1991) Basic properties of umami and effects on humans. *Physiol Behav, 49*(5), pp. 833-41.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C. and Li, X. (2010) Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4752-7.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Xu, H., Pronin, A., Liu, H., Tachdjian, C. and Li, X. (2008) Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(52), pp. 20930-4.

Zhang, J., Zhao, M., Su, G. and Lin, L. (2019) Identification and taste characteristics of novel umami and umami-enhancing peptides separated from peanut protein isolate hydrolysate by consecutive chromatography and UPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Food Chem, 278*, pp. 674-682.

Zhang, Y., Venkitasamy, C., Pan, Z., Liu, W. and Zhao, L. (2017) Novel Umami Ingredients: Umami Peptides and Their Taste. *J Food Sci, 82*(1), pp. 16-23.

Zhao, C. J., Schieber, A. and Ganzle, M. G. (2016) Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Res Int, 89*(Pt 1), pp. 39-47.

Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell, 115*(3), pp. 255-66.

Zhao, M., Xu, X. Q., Meng, X. Y. and Liu, B. (2018) The Heptahelical Domain of the Sweet Taste Receptor T1R2 Is a New Allosteric Binding Site for the Sweet Taste Modulator Amiloride That Modulates Sweet Taste in a Species-Dependent Manner. *66*(2), pp. 207-213.

Supplemental data

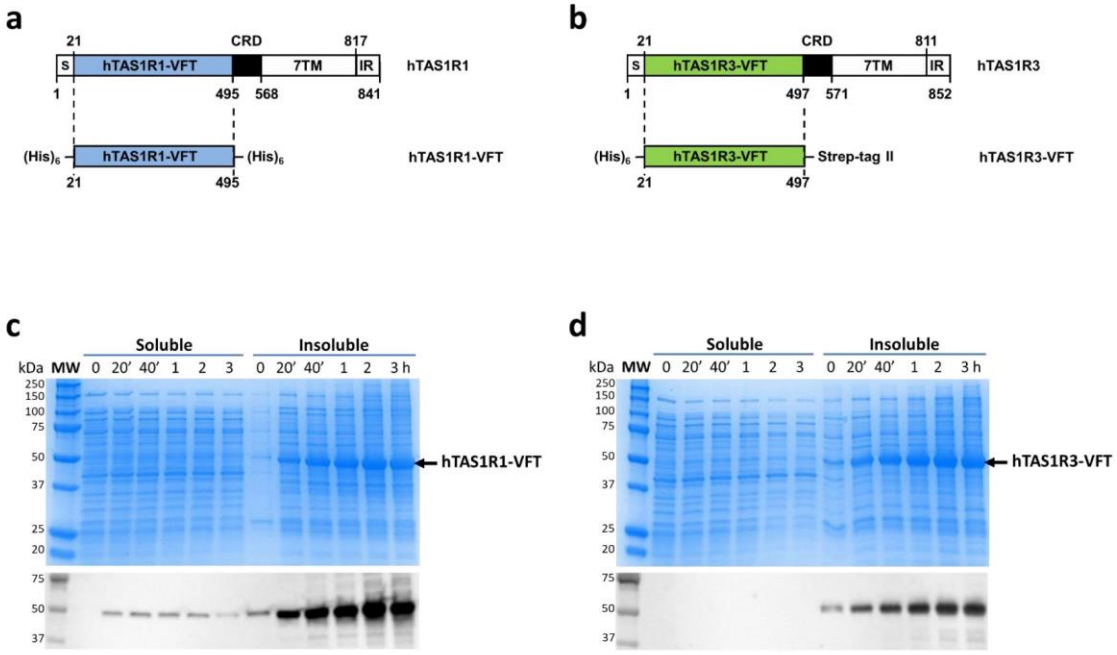

Figure S1. Strategy used for expression of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFT proteins in bacteria. Schematic diagram of the expression construct (**a**) pET28-hTAS1R1-VFT and (**b**) pET28-hTAS1R3-VFT. Length is presented according to its primary amino acid sequence deduced from hTAS1R1 cDNA (GenBank ID: NM_177540) and hTAS1R3 cDNA (GenBank ID: NM_152228). The numerical positions of amino acid residues for each subunit are indicated. The Venus Fly Trap domain (VFT) was expressed independently from the transmembrane heptahelical domain (TMD) minus a short putative signal peptide (S), and the cysteine-rich region (CRR). The double-tagged recombinant proteins expressed in this study are shown below.
SDS–PAGE and Western Blot analysis of (**c**) hTAS1R1-VFT and (**d**) hTAS1R3-VFT expressed in *E. coli. BL21 (DE3)* cells transformed with pET28-hTAS1R1-VFT or pET28-hTAS1R3-VFT were induced with IPTG until 3 h. Soluble and insoluble protein fractions (inclusion bodies) were separated and loaded onto 4-15% SDS–polyacrylamide gel with size control of molecular mass markers (lane MW). Proteins were stained with Coomassie blue or subjected to transfer on PVDF membrane. The mouse anti-His primary antibody (Bio-Rad) diluted at 1/500 and the goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1/25000) were used. The protein antibody complexes were detected using an ECL chemiluminescent kit and the Chemidoc XRS Imaging System (Bio-Rad). Position of hTAS1R-VFTs are indicated by an arrow.

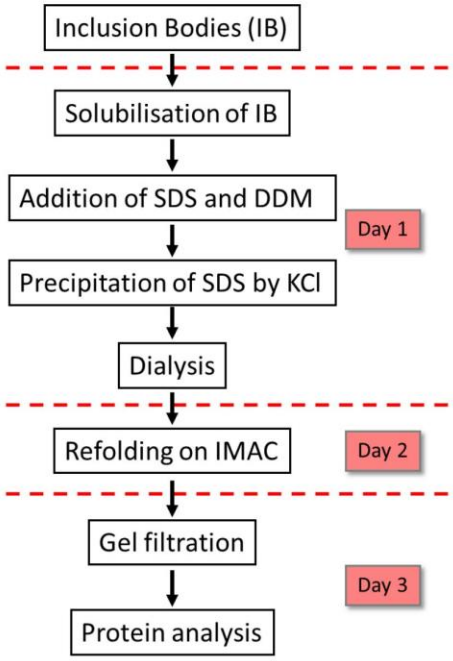

Figure S2. Outline of the strategy for the production of hTAS1R-VFT proteins. Inclusion bodies (IB) were solubilized in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.6% SDS, 8 M urea, 25 mM DTT and 0.1 mM DDM. After removal of urea by dialysis, SDS was decreased to 0.06%. Just before SDS 0.6% and DDM SDS removal by KCl precipitation, DDM was adjusted to 5 mM. The SDS precipitate was removed by centrifugation and the supernatant was dialyzed against dialysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT and 0.1 mM DDM), then subjected to refolding on IMAC. Gel filtration was performed using a Superdex 200 10/300GL column.

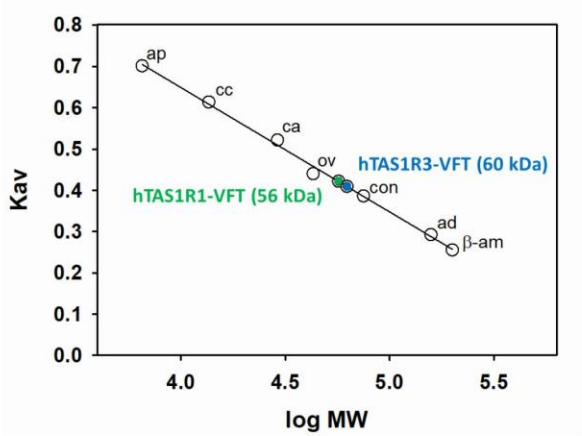

Figure S3. Gel filtration chromatography calibration. The calibration was performed using a Superdex increase 200 10/300GLcolumn (GE Healthcare). The column was equilibrated and eluted with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT and 0.1 mM DDM. The calibration curve for the Superdex 200 column was established with β-amylase (β-am, 200 kDa), aldolase (ad, 158 kDa), monomeric BSA (bsa, 66 kDa), chicken egg ovalbumin (ov, 43 kDa), carbonic anhydrase (ca, 29 kDa), cytochrome C (cc, 12.4 kDa) and aprotinin (ap, 6.5 kDa). The estimated molecular mass of hTAS1R1- and hTAS1R3-VFTs are 56 kDa and 60kDa, respectively.

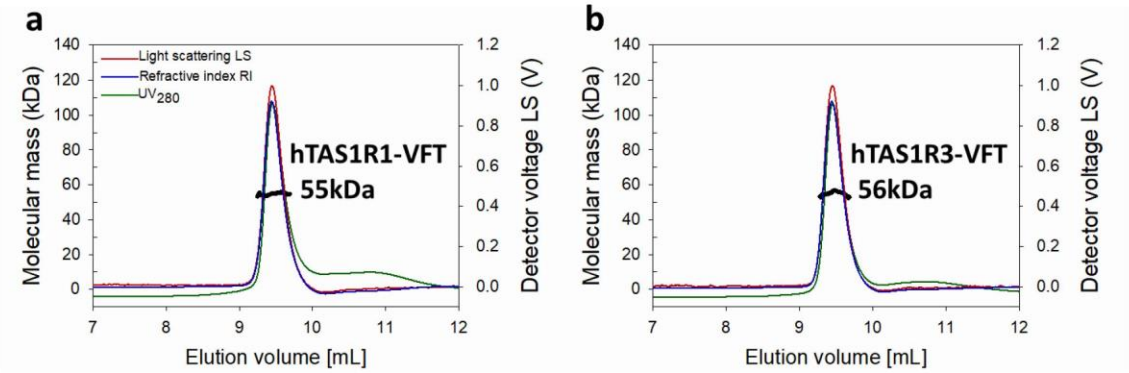

Figure S4. SEC-MALS analysis of hTAS1R-VFT proteins. Peak observed in the previous SEC analysis (see Fig. 1) were subjected to a weight analysis using SEC coupled to a triple-angle light scattering detector, a UV detector (280 nm) and a differential refractometer with gel filtration column KW-803 (Shodex) in buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.1 mM DDM. The numbers printed next to the peaks are the average MW values (kDa) for the entire peak. One main monomeric form with a fitted molecular mass of (**a**) 55 kDa and (b) 56 kDa was observed for hTAS1R1-VFT and hTAS1R3-VFT, respectively.

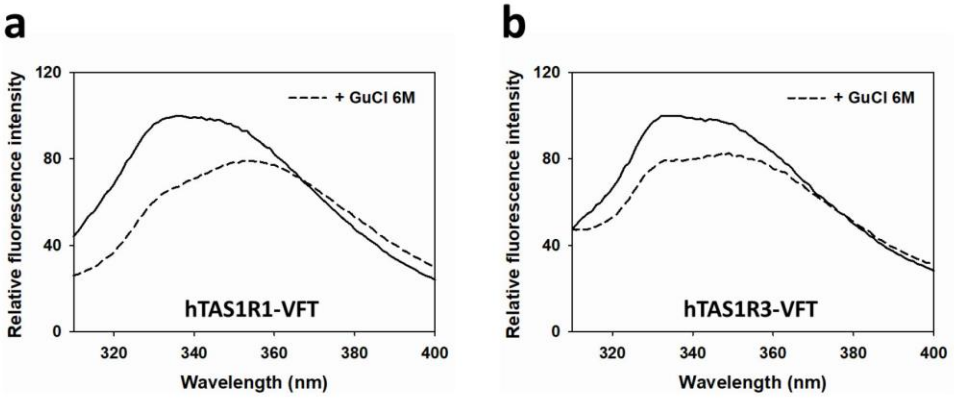

Figure S5. Chemical denaturation of hTAS1R-VFT proteins followed by intrinsic tryptophan fluorescence. Addition of 6M guanidinium chloride (GuCl) induced (**a**) a red shift of 17 nm of the emission maximum and 40% decrease in tryptophan fluorescence intensity for hTAS1R1-VFT and (**b**) a red shift of 16 nm of the emission maximum and 21 % decrease in fluorescence intensity for hTAS1R3-VFT. These data confirmed that the refolded **hTAS1R-VFT** proteins were properly folded.

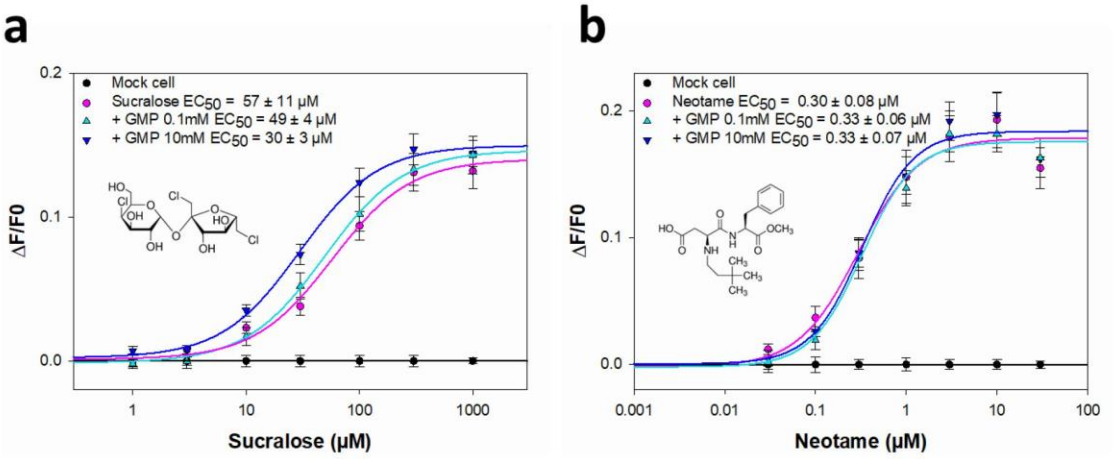

Figure S6. Impact of GMP addition on the response of TAS1R2/hTAS1R3 to sucralose and neotame. For calcium experiments, hTAS1R2/hTAS1R3 was expressed in HEK293T-Gα16gust44 cells and challenged with sweet compounds alone (pink line) or in presence of 0.1 mM GMP (light blue line) or 10 mM GMP (dark blue line). The data were fitted with sigmoid dose-response curves and the EC50 values were calculated using Sigma Plot software. The results are shown as the mean ± SEM of at least three independent experiments.

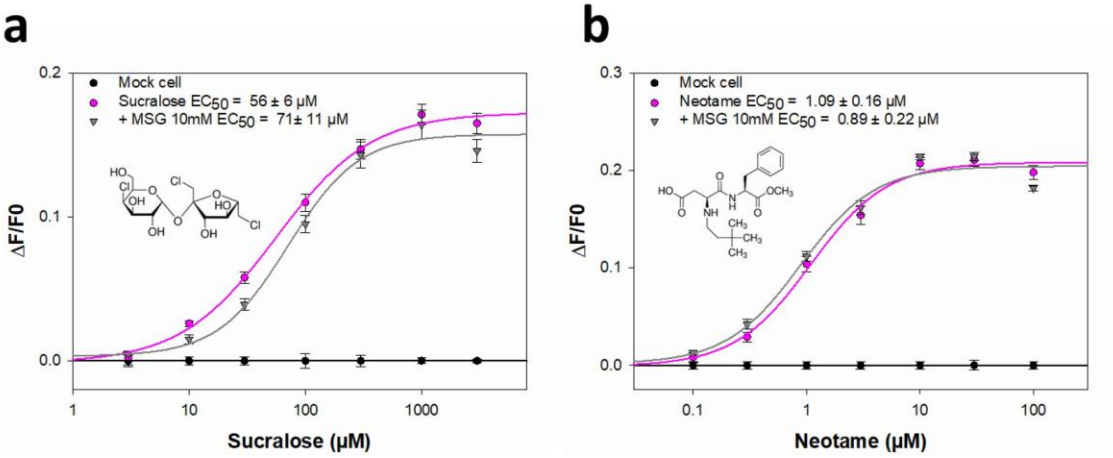

Figure S7. **Impact of MSG addition on the response of TAS1R2/hTAS1R3 to sucralose and neotame**. The inhibitory effect of MSG was evaluated by using intracellular calcium assay. hTAS1R2 and hTAS1R3 were co-expressed in HEK293T-Gα16gust44 cells and challenged with (**a**) sucralose or (**b**) neotame alone (pink line) or in presence of 10 mM MSG (grey line) Application of MSG did not inhibit the response of the sweet cells to neotame.

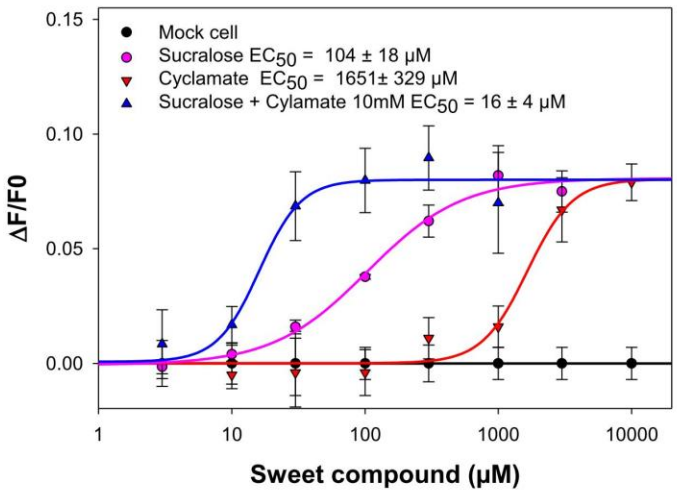

Figure S4. Cyclamate increases sucralose potency of hTAS1R2/hTAS1R3. The sucralose EC50 value was decreased from 104 µM ± 18 µM to 16 ± 4 µM in the presence of 10 mM of cyclamate. The responses of mock transfected cells are unresponsive to either sweet compounds.

III. Article 4 :

Biophysical and functional characterization of the human TAS1R2 sweet taste receptor expressed in HEK293S inducible cell line.

Belloir C, Brulé M, Tornier L, Neiers F, Briand L.

à soumettre à : PloSone

Biophysical and functional characterization of the human TAS1R2 sweet taste receptor expressed in a HEK293S inducible cell line

Christine Belloir, Marine Brulé, Lucie Tornier, Fabrice Neiers, Loïc Briand*

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup 21000, France

* Correspondence should be addressed to: Loïc Briand
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université de Bourgogne-Franche Comté, AgroSup, 21000 Dijon, France

Phone: +33-380-693-464
loic.briand@inra.fr

ABSTRACT

Sweet taste perception is mediated by a heterodimeric receptor formed by the assembly of the hTAS1R2 and hTAS1R3 subunits. The subunits hTAS1R2 and hTAS1R3 are class C G-protein-coupled receptors (GPCRs) whose members share a common topology, including a large extracellular N-terminal domain (NTD) linked to a seven transmembrane domain (TMD) by a cysteine-rich domain (CRD). The hTAS1R2-NTD subunit contains the primary binding site for sweet compounds, including natural sugars and high-potency sweeteners, whereas the hTAS1R2-TMD has been shown to bind a limited number of sweet compounds. It has been shown that the TAS1R3-NTD binds natural sugars (sucrose and glucose) and the chlorodeoxysugar sucralose, whereas the hTAS1R3-TMD contains the binding site for the sweeteners cyclamate and neohesperidin dihydrochalcone. Interestingly, the hTAS1R3-CRD has been shown to be crucial for determining the receptor response to the sweet tasting proteins brazzein and thaumatin. To understand the molecular mechanisms governing these receptor-ligand interactions, we overexpressed the hTAS1R2 subunit in a stable tetracycline-inducible HEK293S cell line. Circular dichroism spectroscopic studies revealed that the hTAS1R2 subunit was properly folded with evidence of secondary structures. Using size exclusion chromatography coupled to light scattering, we found that the hTAS1R2 subunit behaves as a dimer. The amount of the dimeric form of purified hTAS1R2 obtained from sixty T225 tissue culture flasks was approximately 2 µg per flask. The ligand binding properties quantified by intrinsic tryptophan fluorescence showed that hTAS1R2 is capable of binding two sweet tastants with K_d values that are in agreement with physiological detection. This study offers a new experimental strategy to identify new sweeteners or taste modulators that act on the hTAS1R2 subunit and is a prerequisite for structural and biophysical studies.

Keywords: sweet taste receptor, sweeteners, TAS1R, HEK293 cells

Introduction

Taste detection is mediated by taste receptors expressed in taste cells that reside in taste buds located in the oral cavity (Behrens and Meyerhof 2011). Sweet tasting compounds are perceived through the activation of a single receptor composed of G-protein coupled receptors (GPCRs), named TAS1R2 (taste receptor type 1, member 2) and TAS1R3 (taste receptor type 1, member 3), while umami stimuli (such as from monosodium glutamate) are perceived through a TAS1R1 (taste receptor type 1, member 1) and TAS1R3 (taste receptor type 1, member 3) heterodimer (Li *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2001). TAS1R subunits are members of the class C GPCR family that includes the metabotropic glutamate receptors (mGluRs), the calcium-sensing receptor (CaSR), and the γ-aminobutyric acid receptor B ($GABA_BR$). The class C architecture is composed of a large extracellular domain composed of the Venus flytrap (VFT) module linked to the characteristic heptahelical transmembrane domain (TMD) by a short cysteine rich domain (CRD). The TAS1R2/TAS1R3 sweet taste receptor is able to detect a wide variety of sweet tasting compounds, including natural sugars, sugar alcohols, and artificial and natural sweeteners (Belloir *et al.* 2017b). Mouse-human chimaera, site-directed mutagenesis studies and molecular modelling have revealed that the VFT module of TAS1R2 contains the primary binding site for sweet compounds, where natural sugars (sucrose, glucose, and fructose) and non-caloric sweeteners (aspartame, neotame, sucralose, saccharin Na and acesulfame-K) bind (Assadi-Porter *et al.* 2010b, Li *et al.* 2002, Maillet *et al.* 2015, Masuda *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005, Nuemket *et al.* 2017, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2010). However, at least three other ligand-binding sites have been identified on the two subunits of the TAS1R2/TAS1R3 sweet taste receptor. One binding site is located in the VFT module of TAS1R3, where natural sugars and the chlorodeoxysugar sucralose have been found to bind (Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005). Another binding site is located in the TMD of the same subunit, where the sweeteners cyclamate and neohesperidin dihydrochalcone and the sweet taste inhibitors lactisole and gymnemic acid interact (Jiang *et al.* 2005a, Jiang *et al.* 2005b, Sanematsu *et al.* 2014, Winnig *et al.* 2007). Although the functional role of the CRD of TAS1R3 remains to be elucidated, it has been shown that this domain is also involved in the response to sweet tasting proteins, including brazzein and thaumatin (Jiang *et al.* 2004, Masuda *et al.* 2013). Additionally, it has been shown that the TMD of TAS1R2 interacts with the artificial and natural sweeteners S-819 and perillartine (Cai *et al.* 2016, Servant *et al.* 2011) and with the sweet taste modulator amiloride (Zhao *et al.* 2018). The presence of multiple binding sites on the sweet taste receptor could explain the synergy observed between some sweetener mixtures (Fujiwara *et al.* 2012, Servant *et al.* 2011).

Ligand binding studies conducted with the mouse and human TAS1R2- and TAS1R3-VFTs expressed in *Escherichia coli* have shown that both these TAS1R-VFTs are able to bind natural sugars and the chlorodeoxysugar sucralose with distinct and physiologically relevant affinities (Maitrepierre *et al.* 2012, Nie *et al.* 2005). In addition, Nie and collaborators revealed that mouse TAS1R3-VFT binds sucrose with a higher affinity than TAS1R2-VFT, though this relationship is reversed for glucose (Nie *et al.* 2005). Recently, human TAS1R2-VFT has been expressed in *E. coli* as a fusion protein with the small ubiquitin-like modifier (SUMO). Using NMR and various biophysical approaches, TAS1R2-VFT was shown to bind the dipeptide sweetener

neotame with a dissociation constant (K_d) value in the micromolar range (Assadi-Porter *et al.* 2018).

The relative contribution of the two subunits constituting the heterodimeric TAS1R2/TAS1R3 receptor remains largely unknown. This lack of knowledge is partly due to difficulties in preparing sufficient quantities of functional VFT domains suitable for ligand binding assays and biophysical analysis. We recently reported that hTAS1R3-VFT and hTAS1R2-VFT could be expressed as functional proteins in *Escherichia coli* (Laffitte *et al.* in preparation, Maitrepierre *et al.* 2012). The VFT domain was expressed in inclusion bodies with a high yield as previously reported (Laffitte *et al.* in preparation, Maitrepierre *et al.* 2013). To further understand the structural basis of sweet compound recognition by the sweet taste receptor, we used a new strategy to study the full-length hTAS1R2 protein. hTAS1R2 was overexpressed using a stable tetracycline-inducible HEK293S cell line. The subunit was purified after detergent solubilization, and its correct fold was confirmed using circular dichroism (CD). Using intrinsic tryptophan fluorescence, we demonstrated that hTAS1R2 is able to bind the four sweeteners sucralose, neotame, acesulfame-K and perillartine with physiologically relevant affinities. To demonstrate that the binding is specific, we tested the sweetener cyclamate that binds to hTAS1R3-TMD. This study provides new insights into the molecular determinants of sweet taste perception and opens ways to screen new sweet tasting compounds or taste modulators.

Materials and methods

Chemicals

The sweet tasting molecules (sucralose CAS 56038-13-2, neotame CAS 165450-17-9, acesulfame-K CAS 55589-62-3, sodium cyclamate CAS 139-05-9, perillartine CAS 30950-27-7), EZview™ Red anti-FLAG® M2 Affinity Gel, monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody and FLAG® peptide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The detergents octyl-β-D-glucoside (OG), n-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM), fos-choline 14 (FC14) and Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) were purchased from Anatrace (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom). Stock solutions of sweet tasting molecules (100 mM) were prepared in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, pH 7.4) with 0.1% detergent for ligand binding titration by fluorimetry. For the cellular assay, sweeteners were freshly prepared and dissolved in buffer C1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM pyruvic acid, pH 7.4, 300 mOsm). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), all tissue culture media components, streptavidin-conjugated Alexa Fluor 568 and goat anti-mouse Alexa 488 secondary antibody were purchased from Life Technologies (St Aubin, France).

Construction of a tetracycline inducible HEK293S stable cell line expressing hTAS1R2

The sequence encoding hTAS1R2 was obtained from the online UniProtKB Protein database (accession Q8TE23). The gene was synthesized commercially (DNA 2.0, Menlo Park, CA, USA) and optimized for expression in mammalian cells. Protein expression and purification were facilitated by the addition of the Kozak sequence (GCCACCATGG) immediately before the start codon and by the addition of

the FLAG epitope tag (DYKDDDDK) to the N-terminus of the hTAS1R2 gene after the starting codon. The synthetic cDNA encoding hTAS1R2 was subcloned into the *Nde*I and *Eco*RI restriction sites of the pcDNA5/TO-inducible expression vector (Invitrogen). The resulting expression vector pcDNA5/TO-hTAS1R2 encodes a fusion protein comprising an N-terminal FLAG-tag followed by hTAS1R2. The plasmid was amplified in *E. coli* DH5α cells and purified with the PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

The pcDNA5/TO-Flag-TAS1R2 plasmid was transfected into the human inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S cell line (HEK293S GnTI$^-$) using Fugene HD (Promega, Madison, Wisconsin, USA) (Reeves *et al.* 2002). The HEK293S GnTI$^-$ cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum, nonessential amino acids (0.1 mM), 2 mM GlutaMAX (Gibco, Life Technologies), HEPES (15 mM), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 µg/mL) and blasticidin (5 µg/mL) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 6.7% CO_2. The expression and selection of the clones were carried out as previously described (Belloir *et al.* 2017a) using 125 µg/mL hygromycin. Clones were expanded and screened for the inducible expression of FLAG-tagged hTAS1R2 using media supplemented with 1 µg/mL tetracycline and 5 mM NaBu for 48 h. The expression level of FLAG-hTAS1R2 was estimated by dot blot using mouse anti-FLAG primary antibody (dilution 1/2000). The clone showing the highest level of hTAS1R2 expression under the induction conditions while maintaining undetectable expression without induction was selected and expanded into large-scale culture for use in all subsequent experiments.

Cell extract preparation

The hTAS1R2-HEK293S GnTI$^-$ cells were grown in T225 flasks for 5 days at 37 °C until they reached 80% confluence. The cells were then incubated in medium containing tetracycline (1 µg/mL) and NaBu (5 mM). After 48 h, the adherent cells and cells in suspension were harvested into ice-cold medium, pelleted by centrifugation at 800 *g* for 15 min at 4 °C and washed with PBS containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Cells pellets from 20 flasks were then pooled and centrifuged again. The pooled pellet was flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until purification.

On the day of purification, the cell pellet was thawed on wet ice. The FLAG-tagged hTAS1R2 protein was solubilized by resuspending the cell pellet in ice-cold PBS buffer containing 2% w/v LMNG and a protease inhibitor cocktail (2 mL per T175 flask). The cell homogenate was sonicated for 1 min using a Vibracell 750 sonicator (Sonics & Materials, Newtown, USA) equipped with a 2 mm tip and set to 30% maximum power. The homogenate was further disrupted by high-speed shaking with a tissue lyser (TissueLyser, Qiagen, Hilden, Germany) for 3 min after carbon beads were introduced into each microtube. Finally, the homogenate was incubated for 2 h at 4 °C under strong agitation using a Vortex Genie II mixer (Scientific Industries, Bohemia, USA) and then centrifuged at 105,000 *g* for 1 h at 4 °C. The resulting supernatant was immediately submitted to immunoaffinity purification.

hTAS1R2 purification by immunoaffinity chromatography

To purify the FLAG-tagged hTAS1R2 protein from the cell extract, we used the EZview™ Red anti-FLAG® M2 affinity gel, in which the monoclonal antibody ANTI-FLAG M2 is covalently attached to cross-linked agarose beads. The cell homogenate was mixed with the EZview™ Red anti-FLAG® M2 beads

(binding capacity: 0.6 mg/mL) and rotated for 2 h at 4 °C to capture the FLAG-tagged hTAS1R2. The beads were then transferred into Pierce spin columns and collected by centrifugation at 1500 *g* for 1 min. Then, the beads were washed 5 times with cold PBS containing 0.1% LMNG. After the last wash, the FLAG-tagged hTAS1R2 bound to the beads was eluted by competitive elution with 5 column volumes of a PBS-0.1% LMNG solution containing 100 mg/mL FLAG peptide.

Size exclusion chromatography (SEC)

The FLAG-tagged hTAS1R2 samples that had been eluted from the ANTI-FLAG® M2 beads were pooled and concentrated to 0.3-0.5 mg/mL using a 30-kDa MWCO filter column (Vivaspin, Sartorius, Aubagne, France). The samples were then loaded for gel filtration chromatography (Superdex 200 Increase 10/300GL column) on an Äkta Pure fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The column was equilibrated with 2 column volumes of wash buffer (PBS, 0.1% LMNG, pH 7.3) before the immunopurified FLAG-tagged hTAS1R2 sample was applied. After loading, the column was rinsed with wash buffer at 0.5 mL/min, and the column flow through was monitored by UV absorbance at 280 nm. The molecular masses of the FLAG-tagged hTAS1R2-detergent complexes were estimated by calibrating the column with a gel filtration standard mixture (Sigma-Aldrich). The following standard proteins were used: thyroglobulin (669 kDa), β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), monomeric BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), myoglobin (17 kDa) and lysozyme (14.3 kDa). The protein fractions (0.5 mL) were collected using an automated fraction collector and subjected to immunoblotting analysis.

SEC coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) analysis

The oligomeric state of the purified FLAG-tagged hTAS1R2 protein was determined using an SEC column coupled to a MALS detector. SEC was performed using a Superdex 200 Increase 3.2/300 column (GE Healthcare) and eluted with PBS containing 0.1% LMNG (pH 7.3) at 0.1 mL/min. The protein was detected with a triple-angle light scattering detector (Mini-DAWN™ TREOS, Wyatt Technology) connected to a UV detector (UV 100 SpectraSeries, Thermo Separation Products, Waltham, MA, USA) operating at a wavelength of 280 nm and a differential refractometer (RiD-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan). A 100 µL volume of each sample was injected onto the column. The molecular weights of the protein detergent complexes were determined with ASTRA VI software (Wyatt Technology Santa Barbara, CA, USA). A specific refractive index increment (dn/dc value), which was estimated at 0.185 mL/g, was used for mass calculation. The suitability of the system was assessed by analysing the standard proteins BSA (66 kDa) and β-amylase (200 kDa).

hTAS1R2 secondary structure analysis using circular dichroism spectroscopy

The circular dichroism (CD) spectra of the FLAG-tagged hTAS1R2 samples were recorded at 20 °C using a J-815 Jasco spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier temperature control. The CD spectra were corrected for the buffer and ligand contributions and converted to mean residue ellipticity in deg cm^2 $dmol^{-1}$. The spectra recorded between 178 and 260 nm were averaged over 5 scans accumulated at 0.5 nm intervals with a 50 nm/min scan speed and 5 seconds of response time. Spectra were

smoothed using the Savitzky-Golay convolution filter with a span of 15. The secondary structure proportions were estimated using the deconvolution CDSSTR algorithm available on the DichroWeb website (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml) (Whitmore and Wallace 2004).

Intrinsic tryptophan fluorescence measurements

Intrinsic fluorescence spectra were recorded with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Instruments, Les Ulis, France) equipped with a Peltier temperature control unit. The temperature was maintained at 20 °C. FLAG-tagged hTAS1R2 protein (0.10 µM in PBS, 0.1% LMNG buffer) was excited at 280 nm, and the emission spectra were recorded from 300 to 400 nm, with a 10 nm bandwidth for both excitation and emission in the presence and absence of ligands. The sweetener solutions were freshly prepared in PBS-0.1% LMNG buffer. Successive aliquots of ligand solutions were added to 400 µL of the FLAG-tagged hTAS1R2 solution. A range of ligand concentrations adapted to each compound was tested (0.1 µM to 630 µM for sucralose, 0.1 nM to 100 µM for neotame, 0.1 to 2400 µM for acesulfame-K, 0.1 µM to 1 mM for perillartine and 0.1 µM to 10 mM for cyclamate). The fluorescence measurements were corrected for bleaching and nonspecific buffer quenching. The dissociation constants (K_d) were calculated from a plot of the fluorescence intensity measured at the maximum emission wavelength (340 nm) versus the concentration of total ligand obtained with a standard nonlinear regression method using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). The reported K_d values are the average of triplicate measurements performed on at least three independently purified protein samples.

Immunoblotting analysis of hTAS1R2

The fraction eluted from gel filtration was concentrated by methanol precipitation at -20 °C for 1 h, followed by 12000 *g* centrifugation at 4 °C for 1 h. Pellets were resuspended in 100 µL of buffer (4% SDS, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 10% β-mercapto ethanol). The samples (50 µL/well) were loaded onto 4-15% SDS-PAGE. The molecular weight markers (Dual Xtra Standards, Bio-Rad) were loaded in the first lane of the gel. SDS-PAGE was performed using a Mini-Protean® II system (Bio-Rad). Following electrophoresis at 200 V for 40 min, the proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Trans-lot Turbo PVDF transfer pack, Bio-Rad) using a Trans-Blot Turbo transfer system from Bio-Rad at 1.3 A, 25 V for 10 min. The membranes were blocked in a solution containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk (TBS-T) for 1 h at room temperature. The blots were then incubated with the mouse anti-FLAG M2 primary antibody, diluted at 1/2000 in TBS-T, for 1 h at 4 °C. After washing (five 5 min washes with TBS-T), the membranes were incubated with goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (diluted 1:25000) for 1 h at room temperature and then rinsed five times with TBS-T. The protein antibody complexes were detected using an ECL chemiluminescence kit (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) and the ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

Immunocytochemistry

For immunocytochemical staining analyses, the stable hTAS1R2-HEK293S GnTI$^-$ clones were seeded on 4-well culture slides (Corning Inc., Corning, NY, USA) precoated with BD Cell-Tak adhesive (Corning).

When the cells reached ~90% confluence, they were treated with 1 µg/mL tetracycline and 5 mM NaBu for 48 h. Then, the cells were rinsed twice with Hank's HEPES-balanced salt solution and permeabilized for 5 min in cold acetone-methanol (1:1). To visualize the FLAG-tagged hTAS1R2 expression level, the cells were blocked with 5% goat serum in PBS for 30 min at 25 °C and incubated for 1 h at 25 °C with a 1/500 dilution of the mouse anti-FLAG M2 primary antibody in an antibody diluent (Dako Les Ulis, France). The cells were then rinsed twice with PBS for 5 min and incubated with a 1/400 dilution of the Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (Life Technologies) in the Dako antibody diluent for 1 h at 25 °C to visualize FLAG-tagged hTAS1R2. The cells were analysed using an epi-fluorescence inverted microscope (Eclipse TiE, Nikon, Champigny sur Marne, France) equipped with an 20× objective lens and a LucaR EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, UK). To study the subcellular localization of FLAG-tagged hTAS1R2, the receptor was analysed as previously described. In addition, to visualize the plasma membrane, the cells were cooled on ice for 30 min and then incubated with 2 mg/mL biotin-concanavalin A for 1 h on ice before permeabilization. The plasma membrane was then labelled with Alexa Fluor 568 streptavidin conjugate (dilution 1/500; Life Technologies). After washing the cells with PBS, the chambers were detached from the slide and the coverslips were placed with mounting medium (Dako). The cells were analysed using a two-photon confocal microscope (Nikon A1-MP) equipped with an 60× objective lens (DImaCell platform, University of Burgundy, Dijon, France).

Heterologous expression and calcium assay

We used a calcium imaging assay to establish dose-response curves for the sweet taste receptor hTAS1R2/hTAS1R3 and determine EC_{50} values for the sweet stimuli previously tested in spectrofluorimetric experiments. We cloned the cDNAs coding hTAS1R2 and hTAS1R3 subunits into pcDNA6 and pcDNA4 expression plasmids, respectively. HEK293T cells stably transfected with Gα16gust44 were seeded at a density of 0.35 $\times 10^6$ cells per well into 96-well black walled, clear bottom microtiter plates (Falcon) in high-glucose DMEM supplemented with 2 mM GlutaMAX, 10% dialyzed foetal bovine serum, penicillin/streptomycin and G418 (400 µg/mL) at 37 °C and 6.3% CO_2, in a humidified atmosphere. After 48 h, the cells were transiently transfected with each TAS1R sub-unit (60 ng/well for each plasmid) using Lipofectamine 2000 (0.4 µL/well). After a further 24 h incubation, the cells were loaded with Fluo4-AM (Molecular Probes) diluted in buffer C1 for 1 h and then stimulated with sweet tasting compounds. After excitation at 488 nm, calcium responses were recorded at 510 nm using a Molecular Devices FlexStation 3 system. Acquisition was made simultaneously from 8 wells corresponding to the range of taste solutions. We averaged the responses of three wells receiving the same stimulus. We subtracted the mean calcium traces of mock-transfected cells stimulated with the same concentration of stimulus. Plots of the fluorescence variation amplitude versus concentration were fitted by four-parameter logistic nonlinear regression allowing us to calculate the EC_{50} values of activation.

Results

Expression of hTAS1R2 in the HEK293S GnTI- inducible cell line

After transfection with the pcDNA5/TO-FLAG-hTAS1R2 plasmid and antibiotic selection, thirty-three HEK293S-GnTI- clones were subjected to induction in media supplemented with tetracycline or a combination of tetracycline and NaBu. Dot blot analysis of the cell lysates revealed that tetracycline alone does not allow an induction of the selected clones. In contrast, for two clones, the combination of tetracycline and NaBu allowed the induction of high amounts of FLAG-hTAS1R2. The highest expression was observed with clone 7 (Figure 1). Consequently, this clone was selected for subsequent experiments. Cell-based immunocytochemistry experiments confirmed FLAG-tagged hTAS1R2 expression using a combination of tetracycline and NaBu (Figure 2). The subcellular localization of the hTAS1R2 protein was investigated using confocal microscopy. This analysis revealed that most of the expressed protein is localized intracellularly with a minor portion present at the cell surface.

Detergent screening and purification of hTAS1R2

To purify the expressed hTAS1R2, we first investigated which detergent was able to solubilize hTAS1R2; consequently, we performed a small detergent screen that included the main detergents that have been successfully used to solubilize several other GPCRs (Cherezov *et al.* 2007, Hauser *et al.* 2017, Liu *et al.* 2014, Palczewski *et al.* 2000, Rosenbaum *et al.* 2009). These detergents include zwitterionic fos-choline 14 (FC14) and three non-ionic detergents, dodecyl maltoside (DDM), octyl glucoside (OG) and lauryl maltose

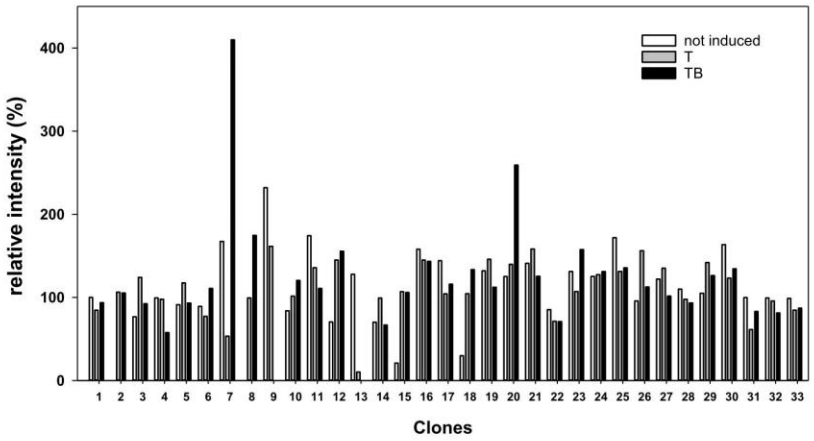

Figure 1. Immunoblot analysis of HEK293S-GnTI- clones stably transfected with pcDNA5/TO-FLAG-hTAS1R2. Each clone was tested for induction with tetracycline alone (1 µg/mL) or in combination with 5 mM NaBu. Three microliters of solubilized protein from cell lysates (3 µg) were loaded onto PVDF membranes, analysed using the dot blot technique and probed with monoclonal FLAG antibody. The results were quantified using Image Lab (Bio-Rad) and normalized to 100% relative intensity. T: tetracycline induction; TB: tetracycline and NaBu induction.

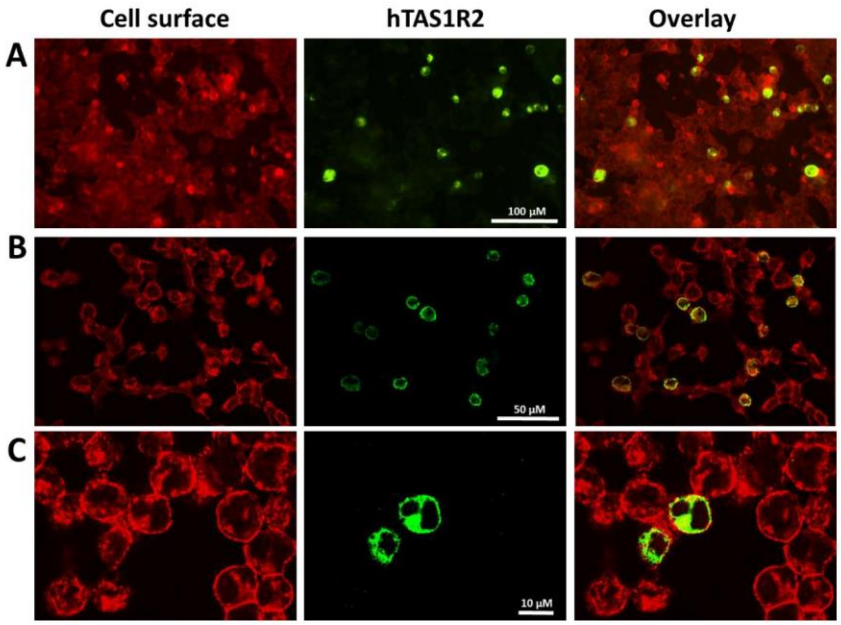

Figure 2. Immunocytochemistry of hTAS1R2-inducible HEK293S cells treated with tetracycline and NaBu. A: Cells from clone 7 were treated with 1 mg/mL tetracycline and 5 mM NaBu for 48 h. The level of induced hTAS1R2 protein was assessed using an anti-FLAG M2 antibody. **B and C**: Cellular localization of hTAS1R2 in stably transfected HEK293S-GnTI- cells treated with 1 mg/mL tetracycline and 5 mM NaBu. The cell surface (shown in red) was detected by biotin-conjugated concanavalin A and streptavidin-conjugated Alexa Fluor 568. The hTAS1R2 receptor (shown in green) was detected using a primary anti-FLAG M2 antibody and a fluorescently labelled secondary antibody (Alexa Fluor 488). The overlay images indicate the localization of the receptor at the cell surface (shown in yellow).

neopentyl glycol (LMNG). The purification was performed according to the protocol described below for each tested detergent. The hTAS1R2 solubilized with the different detergents was purified using FLAG immunoaffinity and analysed using gel filtration (Figure 3). We found that the purified receptor eluted at approximately 13.7 mL, corresponding to a molecular weight of 107 kDa, as calculated from the gel filtration calibration curve (Supplemental Figure S1). The chromatogram revealed an increase in absorbance between 13.5-15 mL for LMNG, DDM and, to a lesser extent, FC14. Functional evaluation of these purified fractions using intrinsic fluorescence revealed that hTAS1R2 extracted by LMNG and FC14 was able to bind sucralose, whereas extraction with DDM and OG led to a non-functional receptor (data not shown). Since LMNG allowed us to obtain higher amount of functional receptor, this detergent was selected for all subsequent analyses.

The LMNG-solubilized hTAS1R2 receptor was purified using a two-step purification process. Coomassie blue SDS-PAGE analysis combined with western blot analysis of the protein purified by anti-FLAG M2 affinity chromatography showed four main bands migrating between 70 and 100 kDa and two other, less intense, migrating bands at 167 and 208 kDa (Figure 4A). Western blot analysis confirmed the presence of FLAG-tagged hTAS1R2 protein migrating around the expected molecular weight (115 kDa) (Figure 4B).

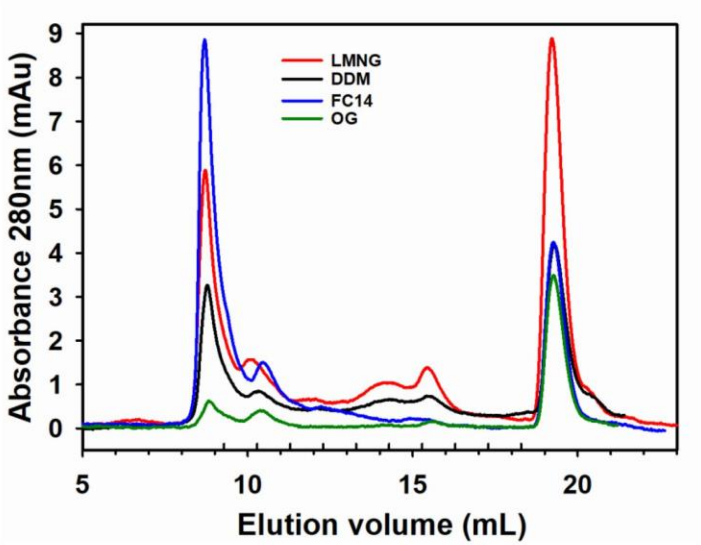

Figure 3: Detergent screen for optimal solubilization and purification of hTAS1R2 expressed in HEK293S cells. Expression of hTAS1R2 was induced with tetracycline (1 µg/mL) and NaBu (5 mM) for 48 h. The hTAS1R2 receptor was solubilized in PBS containing detergent at a concentration of 2% (w/v) for 2 h at 4 °C. After FLAG immunoaffinity purification, the eluate was concentrated to 0.3 mg/mL, loaded on a Superdex 200 3.2/300 column and eluted with PBS containing 0.1% detergent (pH 7.3) at 0.5 mL/min. Purified hTAS1R2 eluted at approximately 13.7 mL. Detergent abbreviations: LMNG, Lauryl maltose neopentyl glycol; DDM, n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside; FC14, Fos-choline 14; OG, Octyl-β-D-glucoside.

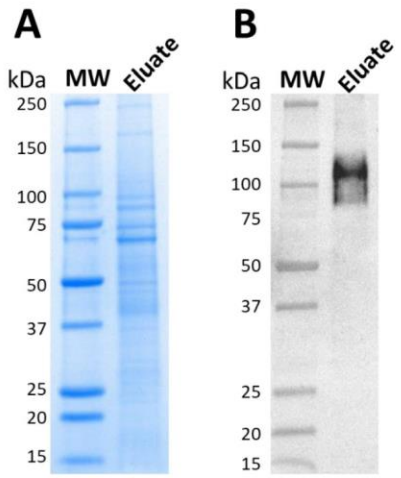

Figure 4. Analysis of immunoaffinity purified hTAS1R2. FLAG-tagged hTAS1R2 was solubilized in PBS containing 2% LMNG and captured using the EZview™ Red anti-FLAG® M2 affinity gel. After elution with FLAG peptide, the eluate was collected, concentrated and subjected to SDS-PAGE followed by (A) staining with Coomassie blue and (B) by western blotting using mouse anti-FLAG M2 primary antibody and goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody.

To further purify the hTAS1R2 receptor and remove the FLAG peptide used for protein elution, the immunoaffinity-purified FLAG-tagged hTAS1R2 protein was subjected to SEC analysis. Six peaks were observed (Figure 5A). Peaks 1 and 6 corresponded to aggregates and the FLAG peptide, respectively. SDS-PAGE and western blot analysis using anti-FLAG M2 antibody showed that peaks 4 and 5 mainly contained monomeric FLAG-tagged hTAS1R2 that migrated at 100 kDa; however, three other bands at 92, 76 and 71 kDa were detected by Coomassie blue staining. Peaks 2 and 3 showed an intense band migrating at approximately 75 kDa, as observed by SDS-PAGE but not by western blotting (Figures 5B-5C). The total yield of the FLAG-tagged hTAS1R2 protein from peak 4 (fractions 14-16) resulting from sixty T225 flasks was approximately 135 µg (2.2 µg/flask, i.e., 0.08-0.1 µg/10^6 cells in terms of cell productivity).

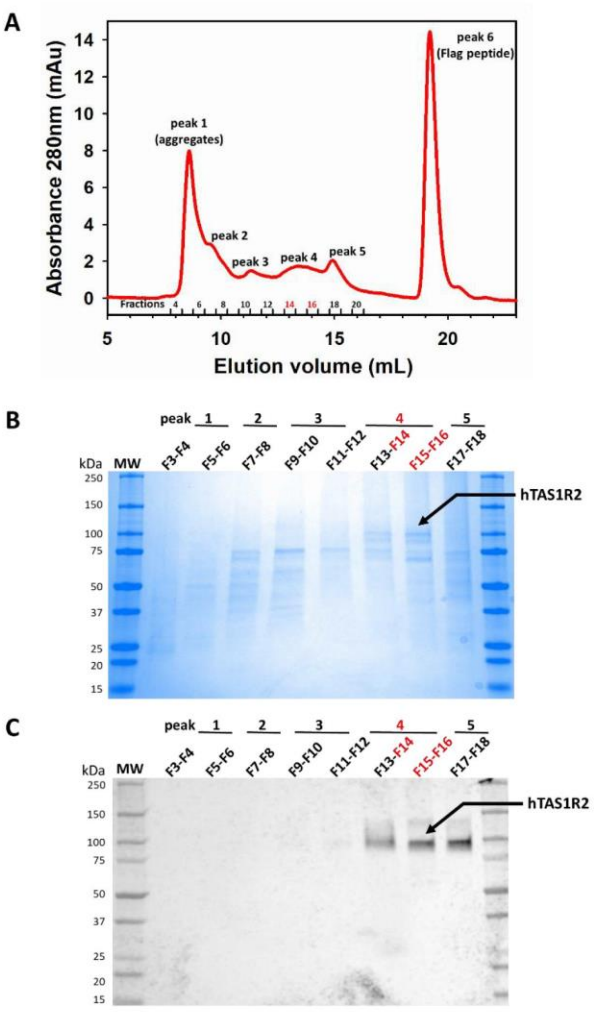

Figure 5. Size exclusion chromatography of immunoaffinity-purified hTAS1R2. A: SEC analysis was performed on an Akta Pure FPLC system equipped with a Superdex 200 Increase 10/300GL column (GE Healthcare). Immunoaffinity-purified hTAS1R2 was eluted using PBS-LMNG 0.1% (pH 7.3). Six distinct peaks were observed, suggesting the presence of several oligomeric forms of the protein. The peak fractions were analysed by (A) SDS-PAGE followed by staining with Coomassie blue and (B) by western blotting using mouse anti-FLAG M2 primary antibody and goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugated secondary antibody. The peak and fraction numbers refer to those designated in (A). Peak 4 (fractions 14-16) contained mainly hTAS1R2.

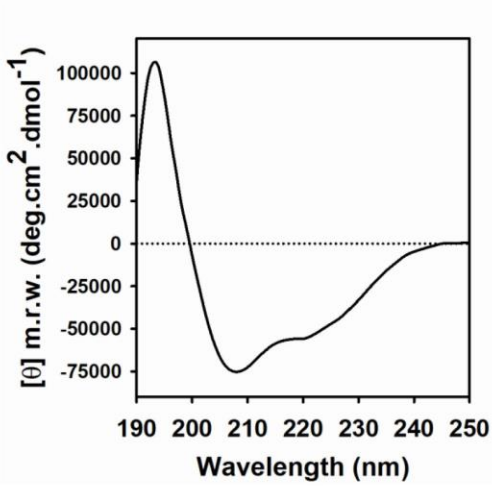

Figure 6. Secondary structure analysis of purified hTAS1R2 using circular dichroism spectroscopy. The far UV CD spectrum of hTAS1R2 recorded in PBS at 0.1% LMNG pH 7.3 shows the presence of a high content of α-helical secondary structures. Protein concentration 1 mg/mL. Light path 0.01 cm.

Secondary structure and oligomerization analysis of the purified hTAS1R2

CD spectroscopy was used to confirm the structural integrity of FLAG-tagged hTAS1R2 purified by SEC (peak 4). The far-UV spectrum of purified FLAG-tagged hTAS1R2 displayed a positive peak centred at 193 nm and two negative peaks at 208 and 222 nm (Figure 6), which clearly showed the helical character of the protein. Deconvolution of the CD spectrum revealed that FLAG-tagged hTAS1R2 was approximately 66% α-helix and 18% β-sheet. This composition is consistent with the secondary structure content of other crystallized class C GPCRs, such as mGluR and GABAb (PDB 6N52 and 4MS4, respectively).

To confirm the oligomerization state of FLAG-tagged hTAS1R2, fractions 14 to 16 corresponding to peak 4 were pooled and analysed using an online SEC coupled to MALS, RI and UV detectors. SEC-MALS allows determination of the direct molecular mass of protein detergent complexes and does not require calibration curves (Slotboom *et al.* 2008). Nevertheless, because the protein was obtained in LMNG detergent at a concentration in buffer above the CMC, the quality of the chromatographic data was validated using two known molecular markers, bovine serum albumin (BSA) and β-amylase (Supplemental Figure S2). Thus, the detergent complexes containing a BSA monomer or β-amylase were correctly resolved, with calculated molecular weights of 66 kDa and 200 kDa, respectively (theoretical molecular weights of 66 kDa and 200 kDa, respectively). The UV analysis at 280 nm-LS (90° angle)-RI overlay of the purified hTAS1R2 revealed the oligomeric states and the presence of the receptor in heterogeneous forms (Figure 7). A predominant dimeric form with a measured mass of 204 kDa was detected after injection of concentrated fractions resulting from gel filtration. The SEC-MALS analysis of the linear and cumulative distribution of the molar mass confirmed that the dimers represented 80% of the total amount, while 20% was still present in monomeric form with an average molecular weight of 100 kDa. The theoretical mass of FLAG-tagged hTAS1R2 is 96.2 kDa; thus, hTAS1R2 appeared mainly as a dimer associated with detergents.

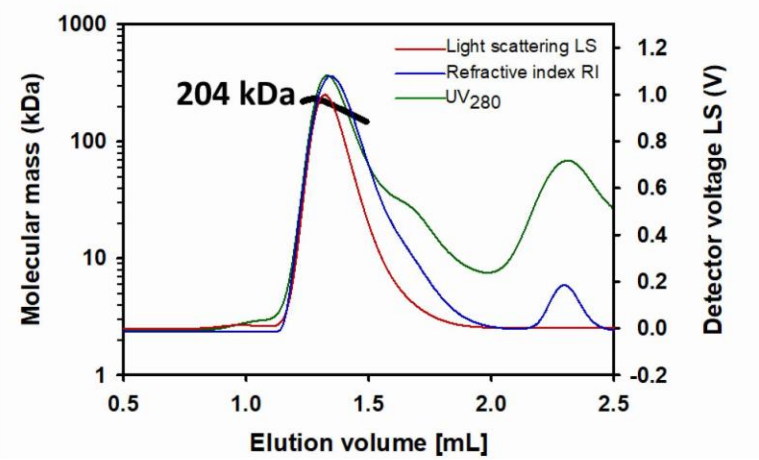

Figure 7. Oligomeric state analysis of purified hTAS1R2. After size exclusion chromatography (SEC) and separation with a Superdex 200 3.2/300 column (GE Healthcare), the molecular mass was determined from the Raleigh ratio, measured by static light scattering and the refractive index. The calculated molecular mass (bold black curve), refraction index (blue curve), light scattering (red curve) and UV at 280 nm (green curve) are shown. A main oligomeric form with a measured mass of 204 kDa was detected, indicating the presence of a dimeric hTAS1R2 form associated with detergents.

Ligand binding properties of the purified hTAS1R2

To characterize the interactions of purified FLAG-tagged hTAS1R2 with its ligands, we determined the dose-response relationship of its intrinsic tryptophan fluorescence upon titration with sweeteners previously demonstrated to bind the hTAS1R2 subunit (Assadi-Porter *et al.* 2010b, Cai *et al.* 2016, Li *et al.* 2002, Maillet *et al.* 2015, Masuda *et al.* 2012, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2018). We first tested the ability of neotame, sucralose, and acesulfame-K to bind to hTAS1R2. These compounds have been shown to bind hTAS1R2-VFT (Assadi-Porter *et al.* 2010b, Masuda *et al.* 2012, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2010). The addition of neotame, sucralose, and acesulfame-K increased the fluorescence intensity of hTAS1R2. We found that neotame was the highest affinity ligand, exhibiting a K_d value of 2.78 ± 0.69 µM (Figure 8B). We observed that sucralose, acesulfame-K and perillartine bound hTAS1R2 with lower affinities (K_d values of 29 ± 8 µM, 164 ± 53 µM and 373 ± 110 µM, respectively) (Figures 8A, 8C, 8D). As a negative control, we tested the sweetener cyclamate, which has been shown to interact with the TMD of hTAS1R3 (Jiang *et al.* 2005b, Winnig *et al.* 2007). As expected, cyclamate addition had no effect on the intrinsic fluorescence of hTAS1R2. These data demonstrated that the purified hTAS1R2 protein is functional and able to specifically bind sweet molecules with micromolar affinities.

To validate the ligand binding data obtained from the purified hTAS1R2, we performed cellular assays to determine the functional activity of the sweet taste receptor. HEK293T-Gα16gut44 transiently co-transfected with TAS1R2 and TAS1R3 were subjected to sweetener titration and calcium imaging. The lowest EC_{50} value (Figure 9B) was measured for neotame (0.55 ± 0.06 µM), whereas cyclamate had the highest

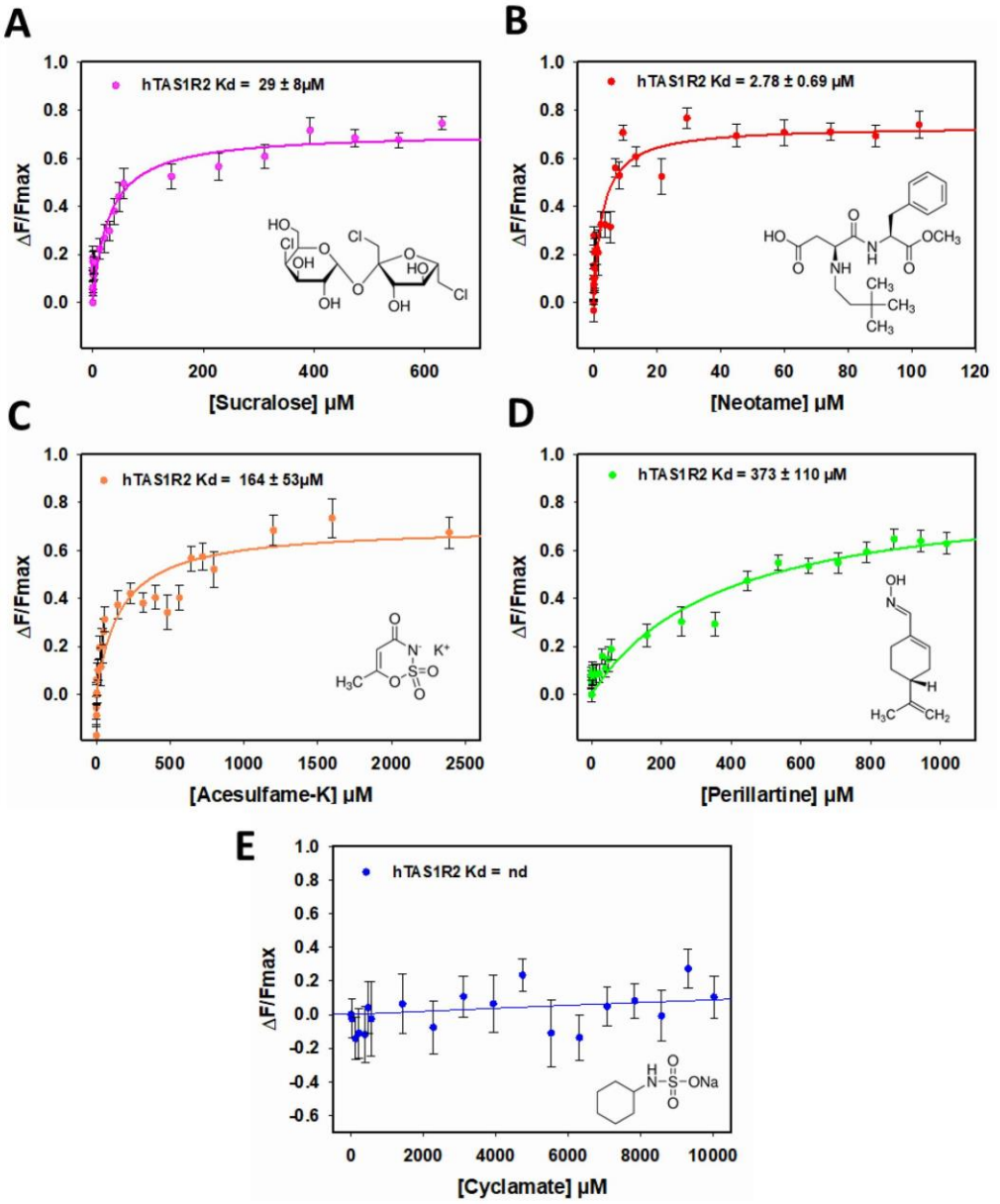

Figure 8. Binding activity of the purified hTAS1R2 using intrinsic tryptophan fluorescence. Intrinsic fluorescence was measured using a Cary Eclipse spectrofluorimeter. Dose-response relationship of hTAS1R2 fluorescence (λex = 280 nm, λem = 340 nm) was observed following sweetener addition. The data were fitted with a standard nonlinear regression method using SigmaPlot software. The reported K_d values are the average of triplicate measurements from at least three independently purified protein samples.

EC_{50} value (917 ± 38 µM) (Figure 9E). These values are in accordance with those previously reported (Assadi-Porter *et al.* 2010a, Cai *et al.* 2016, Liu *et al.* 2011, Masuda *et al.* 2012) and are in agreement with sweetener potencies (Table 1). We tested the sweetener perillartine, which has been demonstrated to bind to hTAS1R2-TMD (Cai *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2018). In addition to activating the hTAS1R2/hTAS1R3 heterodimer, perillartine is capable of activating hTAS1R2 in the absence of hTAS1R3 (Cai *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2018). We found that the perillartine-induced dose-response was strongly shifted towards a higher

concentration range for the TAS1R2 subunit transfected alone, with a lower signal amplitude (decreased by approximately 3-fold), compared to the responses of the heterodimeric sweet taste receptor (Figure 9D). Our data confirm that hTAS1R2 alone, probably as a homodimer, is functional.

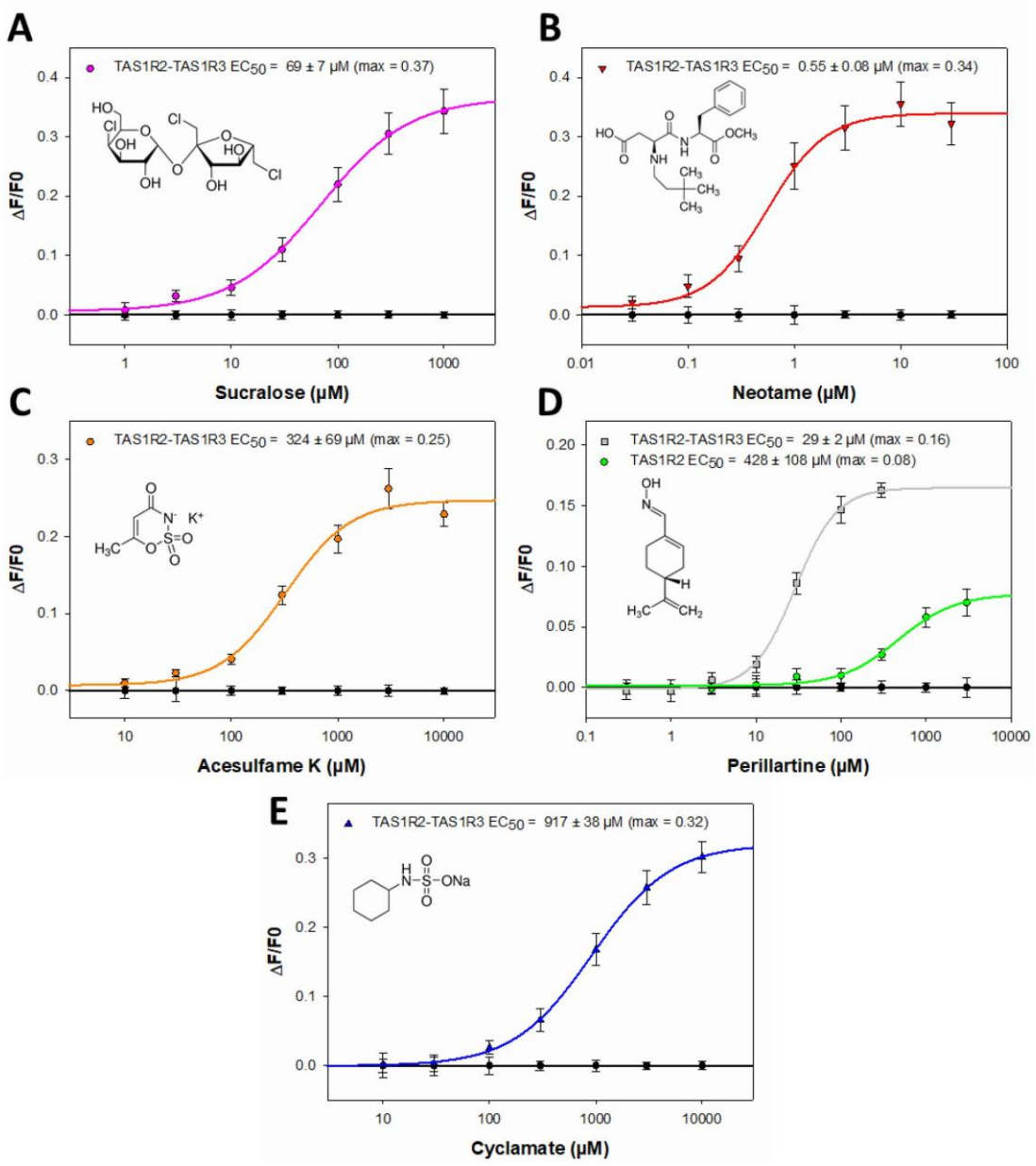

Figure 9. Human TAS1R2/TAS1R3 dose-response curves with different sweeteners. HEK293T-Gα16gust44 cells were transiently transfected with pcDNA6-hTAS1R2 and pcDNA4-hTAS1R3, pcDNA6-hTAS1R2 alone or empty expression vector for the control (filled circles, solid black line). Sweet taste stimuli were automatically applied to the transfected cells, and fluorescence changes were monitored using a FlexStation 3. The logarithmically scaled x-axis indicates the sweetener concentration in µM, and the y-axis shows the variation in fluorescence upon agonist application. Sucralose (pink line), neotame (red line), acesulfame-K (orange line), cyclamate (blue line), and perillartine (grey line for TAS1R2-TAS1R3 and green line for TAS1R2 alone).

Discussion

In this study, the codon-optimized human TAS1R2 gene was overexpressed using the tetracycline-inducible HEK293S GnTI- cell line. Insertion of an N-terminal FLAG epitope tag allowed purification and detection of the recombinant transmembrane protein. We demonstrated the ability of the detergent LMNG to extract and solubilize hTAS1R2, maintaining its functional activity. LMNG is an emerging detergent that has been highlighted for its remarkable ability to enhance structural stability while protecting protein activity (Chae *et al.* 2010, Champeil *et al.* 2016, Lenoir *et al.* 2018, Stetsenko and Guskov 2017). Recently, LMNG has allowed the successful crystallization of several delicate membrane proteins, such as the class A GPCR rhodopsin bound to arrestin (Kang *et al.* 2015), the class B GPCR calcitonin receptor coupled to its heterotrimeric Gs protein complex (Liang *et al.* 2017). Associated with cholesterol hemisuccinate (CHS), LMNG has been used recently to determine the structure of the full-length mGluR5 by cryo-EM (Koehl *et al.* 2019). In our conditions, the addition of CHS during the extraction and solubilization step increased the amount of extracted protein but unfortunately led to a loss of functionality.

SEC-MALS was used to determine the molecular mass of the purified FLAG-tagged hTAS1R2 protein. This analysis shows that recombinant TAS1R2 is mainly present in its dimeric form. Previous studies on mGluR2 demonstrated that class C GPCR dimerization is required to induce agonist activation and G-protein coupling (El Moustaine *et al.* 2012, Kim *et al.* 2017). It has been shown that human TAS1R3 surface expression requires hTAS1R2 co-expression in a specific membrane trafficking system different from that of mice (Shimizu *et al.* 2014). More recently, the structural architecture of the heterodimeric sweet taste receptor was explored and it was revealed that the TAS1Rs C-terminus of the CRD needs to be properly folded for TAS1R3 dimerization and co-trafficking, but not for surface expression of TAS1R2 (Park *et al.* 2019). In this study, the cell surface expression of most FLAG-tagged TAS1R2 mutant libraries was very low, with most protein remaining inside the cell, in accordance with the low expression level we observed. The authors demonstrated that inhibition of surface expression of TAS1R2 is associated with an altered sequence at the C-terminus in the transmembrane domain or cytosolic tail of TAS1R2. The authors highlighted conserved surfaces on the ECD and TMD for dimerization with TAS1R3 (Park *et al.* 2019). However, it is unclear whether the TAS1R2 homodimer structure is physiological or could represent an alternative conformational state, such as the mGluR2 homodimer or heterodimer (mGluR2-mGluR4) (Liu *et al.* 2017). Nevertheless, a cellular assay showed that TAS1R2 transiently expressed alone in HEK293 cells is able to bind perillartine, a sweet compound that interacts with its TMD (Cai *et al.* 2016, Servant *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2018).

To characterize the functional activity of the purified hTAS1R2, we measured the binding affinity of sweet tasting compounds that have been previously shown to activate the sweet taste receptors via cellular assays. We monitored the changes in the intrinsic tryptophan fluorescence as the hTAS1R2 sequence contains 15 tryptophan residues, 13 of which are localized in the NTD. The fluorescence of tryptophan is highly sensitive to the environment. Changes in conformation upon ligand binding may affect the fluorescence of tryptophan residues located at different distances from the binding site. Except for cyclamate, which is known to bind to the TAS1R3-TMD, all of the sweeteners titrated led to an increase in fluorescence, which was saturable. Using this technique, we successfully measured K_d values for the full-length hTAS1R2 subunit, which were in the micromolar range. Our data for sucralose and acesulfame-K are also in

accordance with recently published K_d values measured by the intrinsic fluorescence of hTAS1R2-NTD (40 µM and 100 µM, respectively) (Assadi-Porter *et al.* 2018). Surprisingly, the affinity measured in this study for neotame (0.55 µM) was 18-fold higher compared to the affinity measured on the hTAS1R2-NTD (50 µM). This difference can simply be due to technical differences.

The weak expression of hTAS1R2 on the cell surface does not allow us to obtain sufficient functional activity in calcium imaging assays to determine EC_{50} values using HEK293S-GnTI- cells co-transfected with the plasmid coding for Gα16gust44 and TAS1R3 proteins and treated with the combination of tetracycline and NaBu. To overcome this difficulty, we used HEK293T cells stably transfected with Gα16gust44 and transiently transfected with a plasmid coding for TAS1R2 and TAS1R3. Calcium imaging assays led to determination of EC_{50} values in accordance with previously published data (Assadi-Porter *et al.* 2010a, Cai *et al.* 2016, Li *et al.* 2002, Masuda *et al.* 2012, Xu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2010, Zhao *et al.* 2018). Strikingly, the K_d values determined for the purified hTAS1R2 receptor were in agreement with the EC_{50} values measured using a cellular assay. Furthermore, these data are well correlated with the relative potencies of sweet compounds (Table 1). Interestingly, we reported for the first time a K_d value of 438 µM for perillartine, which is able to bind to the TMD of hTAS1R2 and is in accordance with the 324 µM evaluated using a cellular assay on HEK293T-Gα16gust44 transiently transfected with hTAS1R2 alone.

	K_d (µM) hTAS1R2	EC_{50} (µM)	Relative sweetness
Neotame	2.78 ± 0.69	0.55 ± 0.08	11000
Perillartine (hTAS1R2/hTAS1R3)	/	29 ± 2	2000
Perillartine (hTAS1R2)	373 ± 110	428 ± 108	
Sucralose	29 ± 8	69 ± 7	600
Acesulfame-K	164 ± 53	324 ± 69	200
Cyclamate	/	917 ± 38	30-50

Table 1. Biochemical, biological and physiological features of sweet tasting compounds. K_d values were determined by intrinsic tryptophan fluorescence. EC_{50} values were calculated from the ligand dose-response relationship in HEK293T-Gα16gust44 cells transiently transfected with plasmid encoding hTAS1R2 and hTAS1R3 or hTAS1R2 alone for perillartine. The relative sweetness of each sweetener is described on a molar basis.

In conclusion, despite its low expression level and weak targeting to the cell surface, we successfully purified the full-length hTAS1R2 receptor, allowing the performance of biophysical studies and measurement of its affinity for sweet tasting compounds. The use of the inducible mammalian cell expression systems allowed the production of full-length TAS1R2 subunit recombinant proteins with post-translational modifications. Our methodology opens a way to screen new ligands and to biophysically study and understand subunit molecular mechanisms involved in ligand detection and discrimination. These new technologies need to be considered for the subsequent analysis of the functional and structural properties TAS1R2.

References

Assadi-Porter, F. M., Maillet, E. L., Radek, J. T., Quijada, J., Markley, J. L. and Max, M. (2010a) Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor. *J Mol Biol, 398*(4), pp. 584-99.

Assadi-Porter, F. M., Radek, J., Rao, H. and Tonelli, M. (2018) Multimodal Ligand Binding Studies of Human and Mouse G-Coupled Taste Receptors to Correlate Their Species-Specific Sweetness Tasting Properties. *Molecules, 23*(10).

Assadi-Porter, F. M., Tonelli, M., Maillet, E. L., Markley, J. L. and Max, M. (2010b) Interactions between the human sweet-sensing T1R2-T1R3 receptor and sweeteners detected by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta, 1798*(2), pp. 82-6.

Behrens, M. and Meyerhof, W. (2011) Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav, 105*(1), pp. 4-13.

Behrens, M. and Meyerhof, W. (2015) Taste receptors. in Parker, J. K., Elmore, J. S. and Methven, L., (eds.) *Flavour development, analysis andperception in food and beverages*,Cambridge, UK: Woodhead Publishing. pp. 297-329.

Behrens, M., Meyerhof, W., Hellfritsch, C. and Hofmann, T. (2011) Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl, 50*(10), pp. 2220-42.

Belloir, C., Miller-Leseigneur, M. L., Neiers, F., Briand, L. and Le Bon, A. M. (2017a) Biophysical and functional characterization of the human olfactory receptor OR1A1 expressed in a mammalian inducible cell line. *Protein Expr Purif, 129*, pp. 31-43.

Belloir, C., Neiers, F. and Briand, L. (2017b) Sweeteners and sweetness enhancers. *PLoS One, 20*(4), pp. 279-285.

Cai, C., Jiang, H., Li, L., Liu, T., Song, X. and Liu, B. (2016) Characterization of the Sweet Taste Receptor Tas1r2 from an Old World Monkey Species Rhesus Monkey and Species-Dependent Activation of the Monomeric Receptor by an Intense Sweetener Perillartine. *PLoS One, 11*(8), pp. e0160079.

Chae, P. S., Rasmussen, S. G., Rana, R. R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M. A., Kruse, A. C., Nurva, S., Loland, C. J., Pierre, Y., Drew, D., Popot, J. L., Picot, D., Fox, B. G., Guan, L., Gether, U., Byrne, B., Kobilka, B. and Gellman, S. H. (2010) Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat Methods, 7*(12), pp. 1003-8.

Champeil, P., Orlowski, S., Babin, S., Lund, S., le Maire, M., Moller, J., Lenoir, G. and Montigny, C. (2016) A robust method to screen detergents for membrane protein stabilization, revisited. *Anal Biochem, 511*, pp. 31-5.

Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H. J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K. and Stevens, R. C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science, 318*(5854), pp. 1258-65.

El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Baneres, J. L., Rondard, P. and Pin, J. P. (2012) Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109*(40), pp. 16342-7.

Fujiwara, S., Imada, T., Nakagita, T., Okada, S., Nammoku, T., Abe, K. and Misaka, T. (2012) Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chemistry, 130*(3), pp. 561-568.

Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B. and Gloriam, D. E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov, 16*(12), pp. 829-842.

Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., Margolskee, R. F. and Max, M. (2005a) Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem, 280*(15), pp. 15238-46.

Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., Max, M. and Margolskee, R. F. (2005b) Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J Biol Chem, 280*(40), pp. 34296-305.

Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Margolskee, R. F. and Max, M. (2004) The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem, 279*(43), pp. 45068-75.

Kang, Y., Zhou, X. E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T. A., Yefanov, O., Han, G. W., Xu, Q., de Waal, P. W., Ke, J., Tan, M. H., Zhang, C., Moeller, A., West, G. M., Pascal, B. D., Van Eps, N., Caro, L. N., Vishnivetskiy, S. A., Lee, R. J., Suino-Powell, K. M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G. J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatsepin, N. A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy-Chowdhury, S., Conrad, C. E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C. S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, H. N., Spence, J. C., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O. P., Katritch, V., Gurevich, V. V., Griffin, P. R., Hubbell, W. L., Stevens, R. C., Cherezov, V., Melcher, K. and Xu, H. E. (2015) Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature, 523*(7562), pp. 561-7.

Kim, S. K., Chen, Y., Abrol, R. and Goddard, W. A., 3rd (2017) Activation mechanism of the G protein-coupled sweet receptor heterodimer with sweeteners and allosteric agonists. *114*(10), pp. 2568-2573.

Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M. J., Chu, M., Kobilka, T. S., Laeremans, T., Steyaert, J., Tarrasch, J., Dutta, S., Fonseca, R., Weis, W. I., Mathiesen, J. M., Skiniotis, G. and Kobilka, B. K. (2019) Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature, 566*(7742), pp. 79-84.

Laffitte, A., Belloir, C., Poirier, N., Neiers, F. and Briand, L. (in preparation) Functional characterization of the Venus Flytrap domain of the human TAS1R2 sweet taste receptor

Lenoir, G., Dieudonne, T., Lamy, A., Lejeune, M., Vazquez-Ibar, J. L. and Montigny, C. (2018) Screening of Detergents for Stabilization of Functional Membrane Proteins. *Curr Protoc Protein Sci, 93*(1), pp. e59.

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(7), pp. 4692-6.

Liang, Y. L., Khoshouei, M., Radjainia, M., Zhang, Y., Glukhova, A., Tarrasch, J., Thal, D. M., Furness, S. G. B., Christopoulos, G., Coudrat, T., Danev, R., Baumeister, W., Miller, L. J., Christopoulos, A., Kobilka, B. K., Wootten, D., Skiniotis, G. and Sexton, P. M. (2017) Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex. *Nature, 546*(7656), pp. 118-123.

Liu, B., Ha, M., Meng, X. Y., Kaur, T., Khaleduzzaman, M., Zhang, Z., Jiang, P., Li, X. and Cui, M. (2011) Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners. *J Neurosci, 31*(30), pp. 11070-6.

Liu, J., Zhang, Z., Moreno-Delgado, D., Dalton, J. A., Rovira, X., Trapero, A., Goudet, C., Llebaria, A., Giraldo, J., Yuan, Q., Rondard, P., Huang, S., Liu, J. and Pin, J.-P. (2017) Allosteric control of an asymmetric transduction in a G protein-coupled receptor heterodimer. *Elife, 6*, pp. e26985.

Liu, W., Wacker, D., Wang, C., Abola, E. and Cherezov, V. (2014) Femtosecond crystallography of membrane proteins in the lipidic cubic phase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 369*(1647), pp. 20130314.

Maillet, E. L., Cui, M., Jiang, P., Mezei, M., Hecht, E., Quijada, J., Margolskee, R. F., Osman, R. and Max, M. (2015) Characterization of the Binding Site of Aspartame in the Human Sweet Taste Receptor. *Chem Senses, 40*(8), pp. 577-86.

Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2012) Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. *Protein Expr Purif, 83*(1), pp. 75-83.

Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2013) An efficient Escherichia coli expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered, 4*(1), pp. 25-9.

Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T. and Ishiguro, M. (2012) Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS One, 7*(4), pp. e35380.

Masuda, T., Taguchi, W., Sano, A., Ohta, K., Kitabatake, N. and Tani, F. (2013) Five amino acid residues in cysteine-rich domain of human T1R3 were involved in the response for sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochimie, 95*(7), pp. 1502-5.

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature, 416*(6877), pp. 199-202.

Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell, 106*(3), pp. 381-90.

Nie, Y., Vigues, S., Hobbs, J. R., Conn, G. L. and Munger, S. D. (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol, 15*(21), pp. 1948-52.

Nuemket, N., Yasui, N., Kusakabe, Y., Nomura, Y., Atsumi, N., Akiyama, S., Nango, E., Kato, Y., Kaneko, M. K., Takagi, J., Hosotani, M. and Yamashita, A. (2017) Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. *Nat Commun, 8*, pp. 15530.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science, 289*(5480), pp. 739-45.

Park, J., Selvam, B., Sanematsu, K., Shigemura, N., Shukla, D. and Procko, E. (2019) Structural architecture of a dimeric class C GPCR based on co-trafficking of sweet taste receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry, 294*(13), pp. 4759-4774.

Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R. and Khorana, H. G. (2002) Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(21), pp. 13419-24.

Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. and Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature, 459*(7245), pp. 356-63.

Sanematsu, K., Kusakabe, Y., Shigemura, N., Hirokawa, T., Nakamura, S., Imoto, T. and Ninomiya, Y. (2014) Molecular mechanisms for sweet-suppressing effect of gymnemic acids. *J Biol Chem, 289*(37), pp. 25711-20.

Servant, G., Tachdjian, C., Li, X. and Karanewsky, D. S. (2011) The sweet taste of true synergy: positive allosteric modulation of the human sweet taste receptor. *Trends Pharmacol Sci, 32*(11), pp. 631-6.

Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X. Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., Brust, P., Brune, N., DuBois, G. E., Zoller, M. and Karanewsky, D. S. (2010) Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4746-51.

Shimizu, M., Goto, M., Kawai, T., Yamashita, A. and Kusakabe, Y. (2014) Distinct human and mouse membrane trafficking systems for sweet taste receptors T1r2 and T1r3. *PLoS One, 9*(7), pp. e100425.

Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K. and Erkens, G. B. (2008) Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods, 46*(2), pp. 73-82.

Stetsenko, A. and Guskov, A. (2017) An Overview of the Top Ten Detergents Used for Membrane Protein Crystallization. *Crystals, 7*(7), pp. 197.

Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res, 32*(Web Server issue), pp. W668-73.

Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N. A., Slack, J. P. and Meyerhof, W. (2007) The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol, 7*, pp. 66.

Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M. and Li, X. (2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(39), pp. 14258-63.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C. and Li, X. (2010) Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4752-7.

Zhao, M., Xu, X. Q., Meng, X. Y. and Liu, B. (2018) The Heptahelical Domain of the Sweet Taste Receptor T1R2 Is a New Allosteric Binding Site for the Sweet Taste Modulator Amiloride That Modulates Sweet Taste in a Species-Dependent Manner. *66*(2), pp. 207-213.

Supplemental data

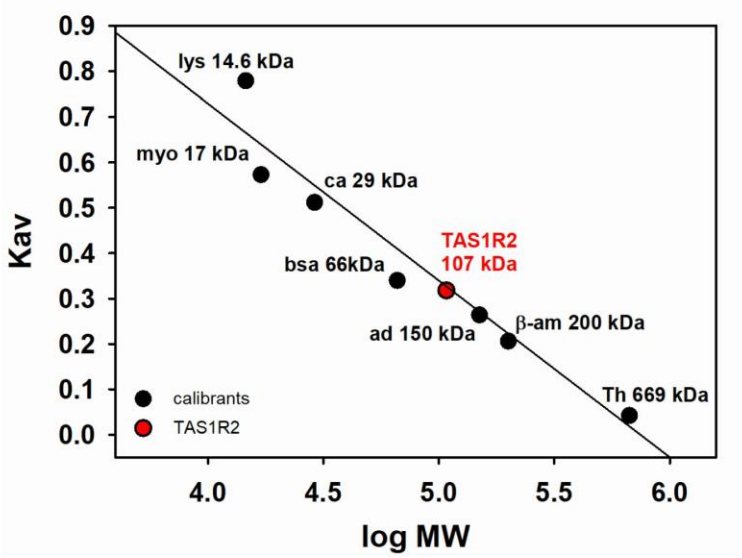

Figure S1. Gel filtration chromatography of the purified hTAS1R2. The calibration curve for the Superdex 200 Increase 10/300GL column (GE Healthcare) was established with thyroglobulin (Th, 669 kDa) β-amylase (β-am, 200 kDa), alcohol dehydrogenase (ad, 150 kDa), monomeric BSA (bsa, 66 kDa), carbonic anhydrase (ca, 29 kDa), myoglobin (17 kDa) and lysozyme (14.6 kDa). The estimated molecular mass of hTAS1R2 is 107 kDa.

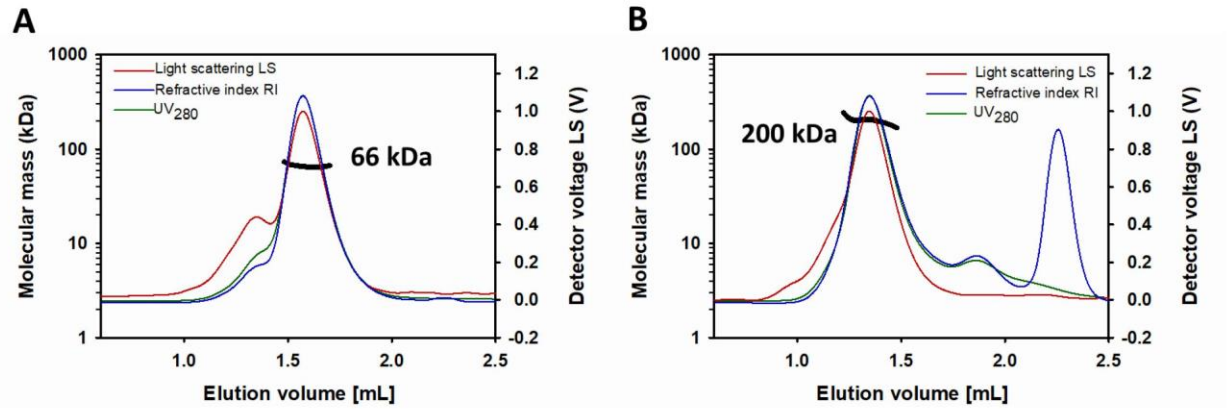

Figure S2. Standard calibration of SEC-MALS. A standard solution of 1 mg/mL (A) serum albumin bovine serum albumin (BSA) or (B) β-amylase prepared in the gel filtration buffer (PBS with 0.1% LMNG) was injected on a gel filtration Superdex 200 3.2/300 column (GE Healthcare) to calibrate the SEC-MALS analysis. The chromatograms show the readings of the light scattering (LS), the differential refractive index (dRI) and UV detectors in red, blue and green, respectively. The scale for the LS detector is shown on the right-hand axis. The thick black line indicates the calculated molecular mass of the eluting protein throughout the chromatogram (scale on the left-hand axis). BSA has a fitted molecular mass of 66 kDa in monomeric form and β-amylase has a fitted molecular mass of 200 kDa, which is in accordance with their theoretical monomer molecular mass values of 66.5 kDa and 200 kDa, respectively.

IV. Article 5 :

Improving human TAS2R14 functional activation in heterologous cell based assays.

Belloir C, Delompré T, Jeannin M, Moitrier L, Neiers F, Briand L.

à soumettre à : Chemical Senses.

Optimized vector for functional expression of the human bitter taste receptor TAS2R14 in HEK293 cells

Christine Belloir, Thomas Delompré, Mathilde Jeannin, Lucie Moitrier, Fabrice Neiers, and Loïc Briand *

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup 21000, France

* Correspondence should be addressed to: Loïc Briand
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, INRA, CNRS, Université de Bourgogne-Franche Comté, AgroSup, 21000 Dijon, France

Phone: +33-380-693-464
loic.briand@inra.fr

ABSTRACT

Bitter is one of the five basic taste qualities along with salty, sour, sweet and umami, which are used by mammals to evaluate the quality of their food and orient feeding behaviour. Bitter taste detection prevents the ingestion of food that is potentially contaminated by bitter-tasting toxins. Bitter taste perception is mediated by a family of G protein-coupled receptors called TAS2Rs. Humans possess 25 TAS2Rs, enabling thousands of chemically diverse bitter compounds to be detected. The identification of agonists/antagonists and molecular mechanisms that govern receptor-ligand interaction has been primarily achieved via the functional expression of TAS2Rs in heterologous cells. However, TAS2R receptors, similar to many other GPCRs, suffer from marginal cell surface expression. In this study, we compared the functionality of 8 engineered chimaeric receptors, focusing our experiments on human TAS2R14, a broadly tuned receptor that recognizes a variety of chemically diverse natural and synthetic bitter substances. Among the different peptide signals that we tested in this study, some lead to a higher potency of aristolochic acid-induced calcium signalling compared with other tested export tags, such as that of bovine rhodopsin, murine Igκ-chain or human mGluR5. We also confirmed that when located at the C-terminus, the FLAG epitope interferes less with the functionality of TAS2R14, thereby enabling reliable evaluation of this receptor at the cell surface using immunohistochemistry.

Keywords: bitter, taste receptor, TAS2R, taste perception, G protein-coupled receptor, calcium imaging

Introduction

The sense of taste enables us to identify and discriminate key nutritional components present in food. Humans are able to discriminate 5 basic taste qualities, that is, sweet, umami, bitter, salty and sour (Briand and Salles 2016). The bitter taste is thought to detect toxins, although an association between bitterness and toxicity is not always the case (Nissim *et al.* 2017). To detect gustatory stimuli, mammals have specialized taste receptor cells, which are organized into groups of 50-150 cells, forming a taste bud. One or multiple taste buds are mainly embedded within morphologically different taste papilla present on the surface of the tongue (Roper 2013).

In humans, bitterness is detected through 25 G protein-coupled receptors (GPCRs) called TAS2Rs (Adler *et al.* 2000, Chandrashekar *et al.* 2000, Matsunami *et al.* 2000, Montmayeur *et al.* 2001). Functional expression assays demonstrated that some TAS2Rs are tuned to detect a small array of structurally related compounds, whereas others are able to be sensitive to a large variety of chemically diverse bitter compounds (Adler *et al.* 2000, Meyerhof *et al.* 2010). This finding may explain how humans are able to detect thousands of bitter compounds with only 25 bitter taste receptors. This recognition capacity was further expanded by the existence of a single nucleotide polymorphism on specific receptors exhibiting true phenotype activity (Chamoun *et al.* 2018, Pydi *et al.* 2014, Reed *et al.* 2006, Roudnitzky *et al.* 2015, Ueda *et al.* 2001).

Extra-oral expression of TAS2Rs widened the scope of action of bitter compound-receptor interactions in other biological functions or pathophysiological states, such as disease and cancer (Behrens and Meyerhof 2010, Behrens and Meyerhof 2011, Lu and Zhang 2017, Shaik *et al.* 2016). TAS2R expression has been found in many extra-oral tissues and organs, including the gastro-intestinal tract (Campa *et al.* 2010, Chen *et al.* 2006, Dotson *et al.* 2008, Gaida *et al.* 2016, Hofer *et al.* 1996, Jang *et al.* 2007, Kaji *et al.* 2009), respiratory system (Deshpande *et al.* 2010, Finger *et al.* 2003, Hariri *et al.* 2017, Kinnamon 2012, Lee and Cohen 2015, Lee *et al.* 2012, Shah *et al.* 2009, Tizzano *et al.* 2010), heart (Foster *et al.* 2013), genito-urinary system (Li 2013, Martin *et al.* 2019, Zheng *et al.* 2017), breast (Singh *et al.* 2014), bone marrow and vascular system (Lund *et al.* 2013) skin (Reszka *et al.* 2015, Shaw *et al.* 2018, Wolfle *et al.* 2015), brain (Ansoleaga *et al.* 2015, Herrera Moro Chao *et al.* 2016, Janssen *et al.* 2011, Singh *et al.* 2011) and endocrine system (Clark *et al.* 2015). These findings enhance TAS2R potential as a target for new emerging drugs.

Agonist and antagonist characterization have been mostly achieved using the functional expression of TAS2Rs in heterologous cell lines. However, a major drawback to investigating ligand-TAS2R relationships in mammals is their weak cell surface expression. To improve functional expression, TAS2Rs have been expressed as chimaeric receptors containing the amino termini of either bovine rhodopsin (Chandrashekar *et al.* 2000) or rat somatostatin receptor subtype 3 (Bufe *et al.* 2002).

In this study, we compared the functional expression of 8 TAS2R14 chimaeras with a widely approved gene construct used as a reference (Meyerhof *et al.* 2010). We focused our study on the human bitter receptor TAS2R14, a deorphanized and broadly tuned receptor that is able to detect approximately 30% of bitter compounds recognized by humans. This receptor is widely characterized and activated by potent, structurally

different bitter substances from both natural and synthetic origins (Behrens *et al.* 2004, Levit *et al.* 2014, Meyerhof *et al.* 2010, Nowak *et al.* 2018). We examined the impact of the QBI SP163 translational enhancer sequence and identified the signal peptide sequence and tag epitope position that are favourably involved in functional expression. Our investigation was carried out using calcium imaging experiments using HEK293T stably expressing Gα16gut44 and transiently transfected with TAS2R14 chimaera constructs (Raliou *et al.* 2011). Protein expression and subcellular localization were also analysed using immunocytochemistry and confocal microscopy.

Materials and methods

Chemicals.

The bitter molecules (aristolochic acid, CAS; picrotoxinin; 1-naphtoic acid; piperonilic acid; flufenamic acid; mefenamic acid; niflumic acid; diclofenac; tributyrin; santonin; genistein; parthenolide) were purchased from Sigma-Aldrich-Merck (Saint-Quentin Fallavier, France). Bitter compounds were freshly prepared and dissolved in buffer C1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM pyruvic acid, pH 7.4, 300 mOsm) when they were soluble or in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 100 mM for the initial solution of insoluble substance. After dilution in buffer C1 of the ranges of concentrations of ligand, DMSO never exceeded 0.1% (v/v) to prevent toxic effects on cells. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and all tissue culture media components were purchased from Life Technologies (St Aubin, France). The anti-FLAG M2 antibody was obtained from Sigma, and the Alexa 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Life Technologies (Life Science, Marnes-la-Coquette, France).

Generation of TAS2R14 expression constructs.

The chimaeric Gα16gust44 was previously described (Raliou *et al.* 2011). This chimaera was generated by replacing the C-terminus of Ga 16 with the C-terminal 44 residues of gustducin and cloned into the pcDNA3.1/Hygro vector (Invitrogen). The reference vector pcDNA5FRT-SST3-hTAS2R14-HSV was generously provided by Pr. W. Meyerhof (German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Germany). In the reference vector, the full coding sequence of wild-type human TAS2R14 (NCBI accession number NM_023922) was amplified by PCR from human genomic DNA and cloned into the pcDNA5FRT vector from Invitrogen. The N-terminus contains the first 45 amino acids of rat somatostatin 3 (SST3) and a C-terminal sequence coding for a herpes simplex virus glycoprotein D epitope (HSV-tag) (Bufe *et al.* 2002, Levit *et al.* 2014). For the constructs used in this study, the 317 amino acid sequence of human TAS2R14 (hTAS2R14) was obtained from the online UniProt protein database (UniProt Q9NV8 also corresponding to NCBI accession number NM_023922.1). The coding region of hTAS2R14 was cloned into the vector pcDNA4/myc-HisA (Invitrogen) between *Eco*RI and *Not*I restriction sites. To improve protein expression in mammalian cells, we used human codon optimization (GeneWiz). We tested, upstream of the start codon, a sequence we called MAX, corresponding to the QBI SP163 element also described in pcDNA4-HisMax (Invitrogen). The QBI SP163 element is built together with a 31 nucleotide fragment of the 5´ cap

sequence of the mouse vascular endothelial growth factor (VEGF) gene fused to a 132-nucleotide fragment of the 5´ untranslated region (UTR) immediately preceding the translational start site of the VEGF gene (Stein *et al.* 1998). This final 163 nucleotide splice variant operates as a strong translational enhancer. To improve TAS2R14 functional expression, we explored two different signal peptides known to target some GPCRs to the plasma membrane, including rat somatostatin 3 (SST3) (Ammon *et al.* 2002) and bovine rhodopsin (Krautwurst *et al.* 1998). We fused the first 45 amino acids of rat SST3 (MAAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSG) or the 36 amino acids of bovine rhodopsin (MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEA PQYYLAEPWQ) in the N-terminal section of the gene. In the same way, we also explored two other peptide signal sequences. The murine Igκ-chain leader sequence (METDTLLLWVLLLWVPGSTG) taken from the pSecTag2 vector (Invitrogen) is described for increasing protein secretion. The peptide signal sequence of human mGluR5 (MVLLLILSVLLLKEDVRGSA) leads to good expression of class C GPCR for CaSR (Jacobsen *et al.* 2017) and GPRC6A (Wellendorph *et al.* 2007). Furthermore, we examined the impact of the FLAG sequence (DYKDDDDK) position between the N- or C-termini on TAS2R14 functional activity (Hopp *et al.* 1988). The FLAG epitope allows immunocytochemical detection of receptor expression, as well as the HSV-tag (QPELAPEDPEDC). Finally, we construct 8 vectors sharing different sequences described in Figure 1 / Supplemental Figure S1. All plasmids were amplified with the QIAfilter Plasmid Midi kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The final constructs were checked by DNA sequencing (Genewiz) for further use in all subsequent cellular studies.

Generation of TAS1R2 and TAS1R3 expression constructs.

Initial TAS1R2 and TAS1R3 constructs were previously described (Raliou *et al.* 2011). TAS1R2 and TAS1R3 were amplified from human genomic DNA and assembled using overlapping primers. The open reading frames of TAS1R2 were cloned into pcDNA3, whereas TAS1R3 was inserted into pcDNA4-myc-HisA (Life Technologies), generating pcDNA3-TAS1R2 and pcDNA4-TAS1R3 plasmids. Then, two new vectors were engineered, and the coding region with native peptide signal of TAS1R2 (UniProt Q8TE23) and TAS1R3 (UniProt Q7RTX0) were cloned in pcDNA6-myc-HisA between *Hind*III and *Not*I and in pcDNA4-myc-HisA between *EcoR*I and *Not*I restriction sites, respectively. Codon optimization was used for human expression (GeneWiz). Finally, upstream of the receptor coding sequence, the QBI SP163 translational element was added as described for TAS2R14 vectors, leading to pcDNA6-MAX-TAS1R2 and pcDNA4-MAX-TAS1R3 plasmids.

Calcium mobilization assay.

HEK293T cells stably transfected with Gα16gust44 (Raliou *et al.* 2011, Ueda *et al.* 2003) were seeded on poly-D-lysine-coated 96-well black plates with a clear bottom ($0.35x10^5$ cell/well) in high-glucose DMEM supplemented with 2 mM GlutaMAX, 10% dialyzed foetal bovine serum Penicillin/Streptomycin and G418 (400 µg/mL) at 37°C and 6.3% CO_2 in a humidified atmosphere. After overnight growth, cells were transiently transfected with receptors TAS2R14 constructs (120 ng/well) using Lipofectamine 2000 (0.4 µL/well) (Invitrogen), and experiments were conducted for all constructs the same day to ensure subsequent comparison of the data. We used FlexStation 3 (Molecular Devices) to measure dose-response curves for each TAS2R14 vector. After 24 h, cells were loaded 1 h at 37°C with Fluo4-AM (Molecular Probes) previously

mixed with Pluronic F-127 (0.01%) and diluted in buffer C1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$ 10 mM pyruvate, 10 mM Hepes; pH 7.4) containing 2.5 mM probenecid (Life Technologies). The calcium signal was recorded at 510 nm after excitation at 488 nm for 90 sec, while the range of ligand was injected simultaneously in 8 wells after 20 sec using a microplate reader FlexStation 3 (Molecular Devices). All substance concentrations were measured in triplicate wells at least three times independently. As cell transfection and bitter compounds could interfere with cellular viability and calcium assays, all compounds were tested on mock-transfected cells for all applied substance concentrations. Calcium signal emission was normalized to background fluorescence. The response from each well was calculated based on the ratio between maximum variation in fluorescence after ligand addition compared to initial fluorescence before addition and expressed as $\Delta F/F$. The fluorescence signals collected for replicate were averaged for the same substance concentration, and the fluorescence changes of corresponding mock-transfected cells were subtracted. The dose-response data were fitted using a four-parameter logistic equation $[f(x)=min+(max-min)/(1+(x/EC_{50})^{nH})]$. The median effective concentrations (EC_{50} values) and maximal values of receptor activation were generated using SigmaPlot software.

Immunocytochemical staining of HEK293T cells

HEK293T-Gα16gust44 cells were seeded on 4-well culture slides ($0.2x10^6$ cells/well) precoated with Corning Cell-Tak adhesive. When the cells reached ~80% confluence, they were transiently transfected with 600 ng cDNA TAS2R14 construct using 2 µL of Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's recommendations. Approximately 24 h post-transfection, the cells were subjected to immunocytochemical staining. Cells were rinsed twice with Hank's HEPES balanced salt solution and cooled on ice for 1 h to avoid endocytosis. For the colocalization of the receptors with the plasma membrane, cells were incubated for 1 h on ice with 20 µg/mL biotin-concanavalin A (Sigma) that bound to glycoproteins. Then, the cells were washed and permeabilized for 5 min in cold acetone-methanol (1:1). After two washes with phosphate-buffered saline (PBS), the cells were blocked with 5% goat serum in PBS for 1 h at room temperature. Next, for the staining receptor, the cells were incubated for 1 h with the primary antibodies mouse anti-FLAG M2 (Sigma F1804) or mouse anti-HSV (Novagen) diluted at 1/400 and 1/10,000 in Dako Antibody diluent (Dako). Cells were then rinsed twice with PBS, and the plasma membrane was visualized with the streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate (Invitrogen, S11226) diluted at 1/2000 in Dako Antibody diluent. After washing with PBS again, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody (Invitrogen) diluted at 1/2000 was applied 1 h at room temperature. Finally, the cells were rinsed with deionized water, and the plastic chamber was detached from the culture slides. Coverslip was fixed with Mounting Medium (Dako). Finally, the cells were analysed using a fluorescence microscope (TiE;Nikon) equipped with a LucaR EMCCD Camera (Andor Technology) for TAS2R14 expression and a two-photon confocal microscope (Nikon A1-MP) equipped with an x60 objective lens (DImaCell platform, University of Burgundy, Dijon, France) for plasma membrane receptor colocalization.

Results

Functional characterization of recombinant hTAS2R14

To investigate the functional expression of hTAS2R14 according to the peptide signal sequence and epitope tag position, calcium imaging experiments were performed. The dose-response relationships obtained by stimulating receptor-transfected cells with different concentrations of the agonist aristolochic acid demonstrate the difference in the responsiveness of chimaeric receptors resulting from all constructs (Figure 1). The EC_{50} values for aristolochic acid using the pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV vector were 2.10 ± 0.41 µM with a maximal amplitude of 0.29 ± 0.01 (Figure 2A). These data are in accordance with previously published values of 2.0 µM (Zhang *et al.* 2017) or with a slight difference, that is, 0.49 ± 0.03 µM (Nowak *et al.* 2018).

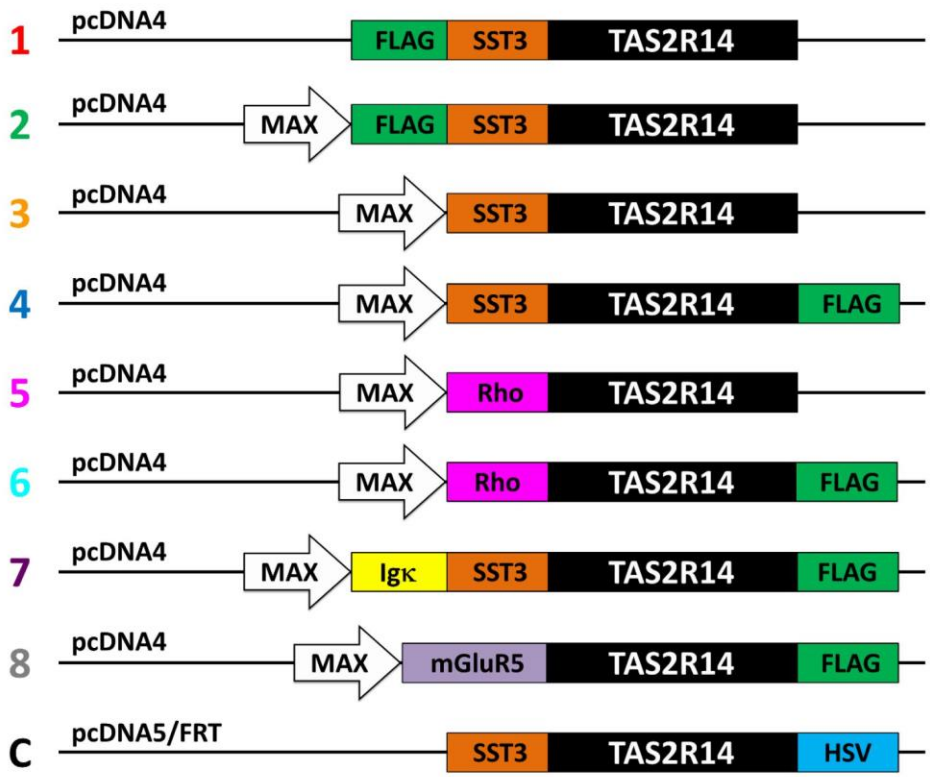

Figure 1. Constructs used for the functional expression of hTAS2R14. Sequences were cloned in the pcDNA4 vector (Invitrogen) for constructs 1 to 8 and in pcDNA5/FRT for the control vector (C). The MAX enhancing translation sequence was inserted upstream for vectors 2 to 8. The signal peptide sequences were from rat somatostatin (SST3), bovine rhodopsin (Rho), murine Igκ-chain leader (Igκ) and human mGluR5 (mGluR5). Epitope tags were added either in the N-terminal or C-terminal position; Flag or Herpes Simplex Virus (HSV).

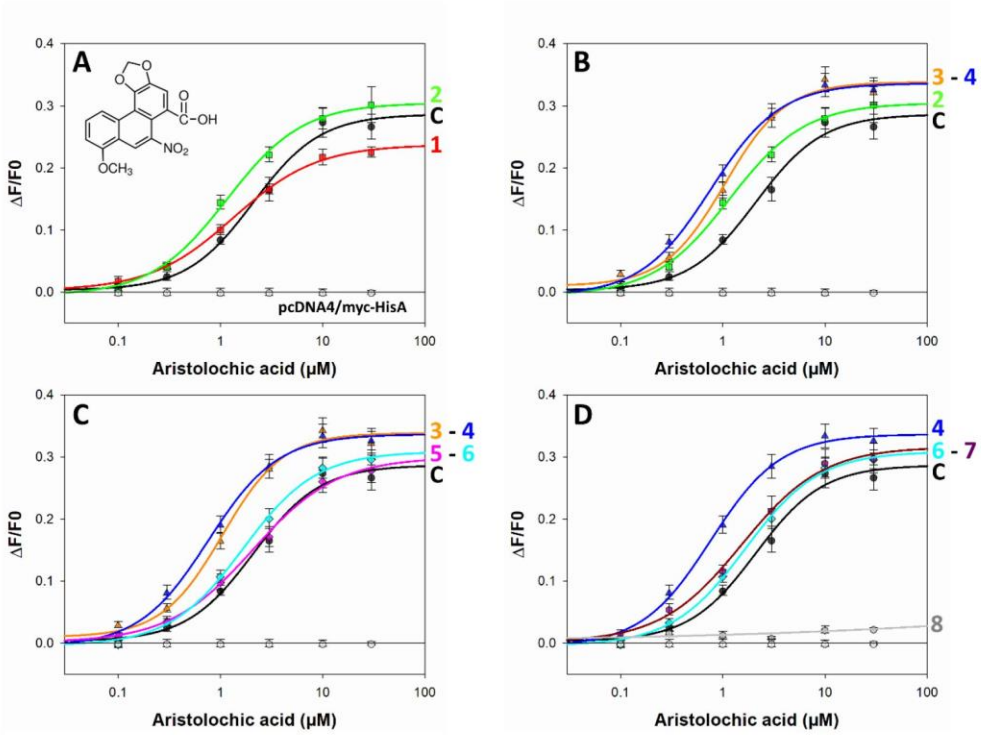

Figure 2. Dose-response relationships of TAS2R14 constructs transfected in HEK293T-Gα16gus44 cells stimulated with aristolochic acid. Construct 1: pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14 (red); 2: pcDNA4-MAX-FLAG-SST3-TAS2R14 (green); 3: pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14 (orange); 4: pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG (blue); 5: pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14 (pink); 6: pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14-FLAG (turquoise); 7: pcDNA4-MAX-Igκ-SST3-TAS2R14-FLAG (dark purple); 8: pcDNA4-MAX-mGluR5-TAS2R14-FLAG (grey) and vector control (C): pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV generously provided by Prof. Meyerhof. Agonist was automatically applied to the transfected cells, and fluorescence changes were monitored. The logarithmically scaled x-axis indicates the compound concentration in μM, and the y-axis shows the relative changes of fluorescence upon agonist application.

Functional activity enhancement by MAX sequence

The construct sharing the same FLAG-SST3-hTAS2R14 sequence but differing by the presence of a non-coding MAX enhancer were compared to the control vector pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV. For each construct, EC_{50}, as well as the maximal signal amplitude, were measured (Table 1). All 3 constructions caused a major response to the selected agonist, demonstrating that pcDNA4 and the pcDNA5/FRT plasmid are suitable for the functional expression of TAS2R14 (Figure 2A). In our case, the pcDNA5/FRT was used as a traditional vector for transient transfection in HEK293T-Gα16gus44 cell lines without the FRT site. In our assay, the arachidonic acid responsiveness was slightly shifted towards a higher concentration range for pcDNA5/FRT compared to the pcDNA4 vector (Figure 2A). The two constructs pcDNA4-FLAG-SST3-hTAS2R14 and pcDNA4-MAX-FLAG SST3-hTAS2R14 are more sensitive, exhibiting EC_{50} values for aristolochic acid of 1.34 ± 0.11 μM and 1.16 ± 0.11 μM, respectively. We found that the presence of the MAX sequence improved the efficacy by 29% (Table 1). These results confirm its enhancer potential. Next, the MAX sequence was kept for all of our other hTAS2R14 constructs.

TAS2R14 construct	sequence	EC_{50} (µM)	x-fold	Maximal amplitude	(%)
1	pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14	1.34 ± 0.11	1.00	0.24 ± 0.01	100
2	pcDNA4-MAX-FLAG-SST3-TAS2R14	1.16 ± 0.12	1.16	0.31 ± 0.01	129
3	pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14	1.05 ± 0.14	1.28	0.34 ± 0.01	142
4	pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG	0.76 ± 0.08	1.76	0.34 ± 0.01	142
5	pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14	2.07 ± 0.26	0.65	0.30 ± 0.01	125
6	pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14-FLAG	1.66 ± 0.15	0.81	0.31 ± 0.01	129
7	pcDNA4-Igκ-SST3- hTAS2R14-FLAG	1.53 ± 0.19	0.88	0.32 ± 0.01	133
8	pcDNA4-MAX-mGluR5-hTAS2R14-FLAG	-	-	0.18 ± 7.07	75
C	pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV	2.10 ± 0.41	0.63	0.29 ± 0.01	121

Table 1. EC_{50} values and maximal amplitudes generated by the different TAS2R14 constructs in response to aristolochic acid stimulation.

Impact of FLAG on functional activity

The FLAG epitope was inserted upstream or downstream of the SST3-hTAS2R14 sequence. Compared to the HSV-tag present in vector control, the FLAG-tag is commonly used to allow protein detection and purification when low levels of protein expression are expected (Einhauer and Jungbauer 2001a, Einhauer and Jungbauer 2001b, Hopp *et al.* 1988). None of the positions of the FLAG-tag prevented the transient expression of the gene of interest (Figure 2B). Compared with the pcDNA4-MAX-SST3-hTAS2R14 construct without the tag sequence, the aristolochic acid activation was the weakest when the FLAG sequence was inserted in the N-terminal position of the SST3-hTAS2R14 sequence. Conversely, the functional expression of hTAS2R14 was strongly enhanced when FLAG was omitted or placed in the C-terminal position. Furthermore, the EC_{50} concentration was almost shifted to a 3-fold lower concentration, and the maximal amplitude increased by approximately 17% for pcDNA-MAX-SST3-hTAS2R14-FLAG compared to the reference vector. A slight difference in aristolochic acid potency was observed between pcDNA4-MAX-SST3-hTAS2R14 (1.05 ± 0.14 µM) and pcDNA4-MAX-SST3-hTAS2R14-FLAG (0.76 ± 0.08 µM), and their efficacies were the same. Taken together, our results confirmed the modulation of hTAS2R14 functional activity by the tag epitope. We also demonstrated that the C-terminal position was preferable and could slightly improve hTAS2R14 sensitivity.

Influence of peptide signal sequence enhancing expression and/or membrane targeting

We compared the first 45 amino acids of the rat somatostatin-3 sequence (SST3), which was also present in the control vector, with the 36 amino acids of bovine rhodopsin (Rho). The exchange of the signal peptide sequence SST3 to Rho in the pcDNA4-MAX-SST3-hTAS2R14 sequence led to a right shift of the dose-response curves (Figure 2C) with a complete loss of potency and efficiency previously acquired by MAX addition. The EC_{50} value (2.07 ± 0.26 µM) and the signal amplitude (0.30 ± 0.01) were returned to its initial level, similar to the control vector. Note that the FLAG-tag in the C-terminus on the pcDNA4-Rho-hTAS2R14-

FLAG resulted in a slightly larger effect on the calcium response compared to pcDNA4-Rho-hTAS2R14, as observed previously between the same construct with SST3.

Therefore, we explored the response to aristolochic acid for the pcDNA4-MAX-Igκ-SST3-hTAS2R14-FLAG plasmid. The addition of the Igκ chain leader sequence upstream of the SST3-hTAS2R14-FLAG sequence reduced responsiveness by 2-fold in potency (1.53 ± 0.19 µM) to that measured for pcDNA4-MAX-SST3-hTAS2R14-FLAG, leading to an equivalent response of pcDNA4-MAX-Rho-hTAS2R14-FLAG (Figure 2D). This result confirmed that the addition of the Igκ sequence to SST3 did not improve TAS2R14 functional expression more than SST3 alone.

Finally, we explored the exchange of the native hTAS2R14 signal peptide sequence by the first 20 amino acids of the mGluR5 signal peptide. This leader sequence has been used to improve the functional expression of the CaSR receptor (Jacobsen *et al.* 2017, Wellendorph *et al.* 2007). Surprisingly, hTAS2R14 functional activity was abolished using this construct with a total loss of calcium signal response (Figure 2D).

Validation of enhancing vector response with other TAS2R14 agonists

To validate the enhancing functional response of our best construct (pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG), we tested bitter compounds previously described for effective dose-response relationships with TAS2R14 (Behrens *et al.* 2004, Levit *et al.* 2014, Meyerhof *et al.* 2010, Nowak *et al.* 2018). We compared this construct with the control vector in pcDNA5FRT and to the pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14. We compared structurally different agonists containing 3 ring structures with picrotoxinin, genistein, parthenolide, santonin, 2 rings for piperonilic acid, 1-naphtoic acid, flufenamic acid and its derivatives mefenamic acid, niflumic acid, diclofenac, 1 ring with (-)-α-thujone, and a linear structure with tributyrin (Figure 3, Table 2).

	1		5		C	
	pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14		pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG		pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV	
TAS2R14 construct	EC_{50} (µM)	Maximal amplitude	EC_{50} (µM)	Maximal amplitude	EC_{50} (µM)	Maximal amplitude
Aritolochic acid	1.34 ± 0.11	0.24 ± 0.01	0.76 ± 0.08	0.34 ± 0.01	2.10 ± 0.41	0.29 ± 0.02
Flufenamic acid	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.40 ± 0.01
Mefenamic acid	1.92 ± 0.25	0.26 ± 0.01	2.85 ± 0.26	0.43 ± 0.01	5.01 ± 0.46	0.45 ± 0.02
Diclofenac	2.98 ± 0.81	0.09 ± 0.01	5.80 ± 1.65	0.21 ± 0.02	14.14 ± 8.95	0.23 ± 0.05
Niflumic acid	0.64 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.60 ± 0.12	0.26 ± 0.01	1.40 ± 0.29	0.25 ± 0.02
1-Naphtoic acid	95.95 ± 15.23	0.10 ± 0.01	72.20 ± 20.89	0.25 ± 0.02	76.27 ± 25.88	0.20 ± 0.02
Piperonic acid	302 ± -	0.05 ± 0.01	398 ± 274	0.12 ± 0.05	501 ± 480	0.10 ± 0.06
Genistein	5.71 ± 1.77	0.06 ± 0.01	5.94 ± 1.37	0.14 ± 0.01	5.18 ± 0.61	0.11 ± 0.01
Santonin	15.53 ± 3.95	0.10 ± 0.01	7.14 ± 0.69	0.14 ± 0.01	85.03 ± 83.21	0.20 ± 0.05
Parthenolide	2.08 ± 0.33	0.13 ± 0.01	3.41 ± 1.19	0.25 ± 0.02	3.06 ± 0.65	0.17 ± 0.01
Picrotoxinin	8.22 ± 6.37	0.08 ± 0.02	5.32 ± 2.62	0.11 ± 0.02	2.84 ± 0.91	0.06 ± 0.01
(-)-α-Thujone	0.29 ± 3.10	0.09 ± 0.01	29.35 ± 6.48	0.22 ± 0.02	37.85 ± 8.06	0.19 ± 0.02
Tributyrin	7.53 ± 0.95	0.20 ± 0.01	10.94 ± 2.58	0.37 ± 0.03	12.65 ± 1.56	0.31 ± 0.01

Table 2. EC_{50} values and maximal amplitudes generated by different TAS2R14 constructs in response to different bitter compounds.

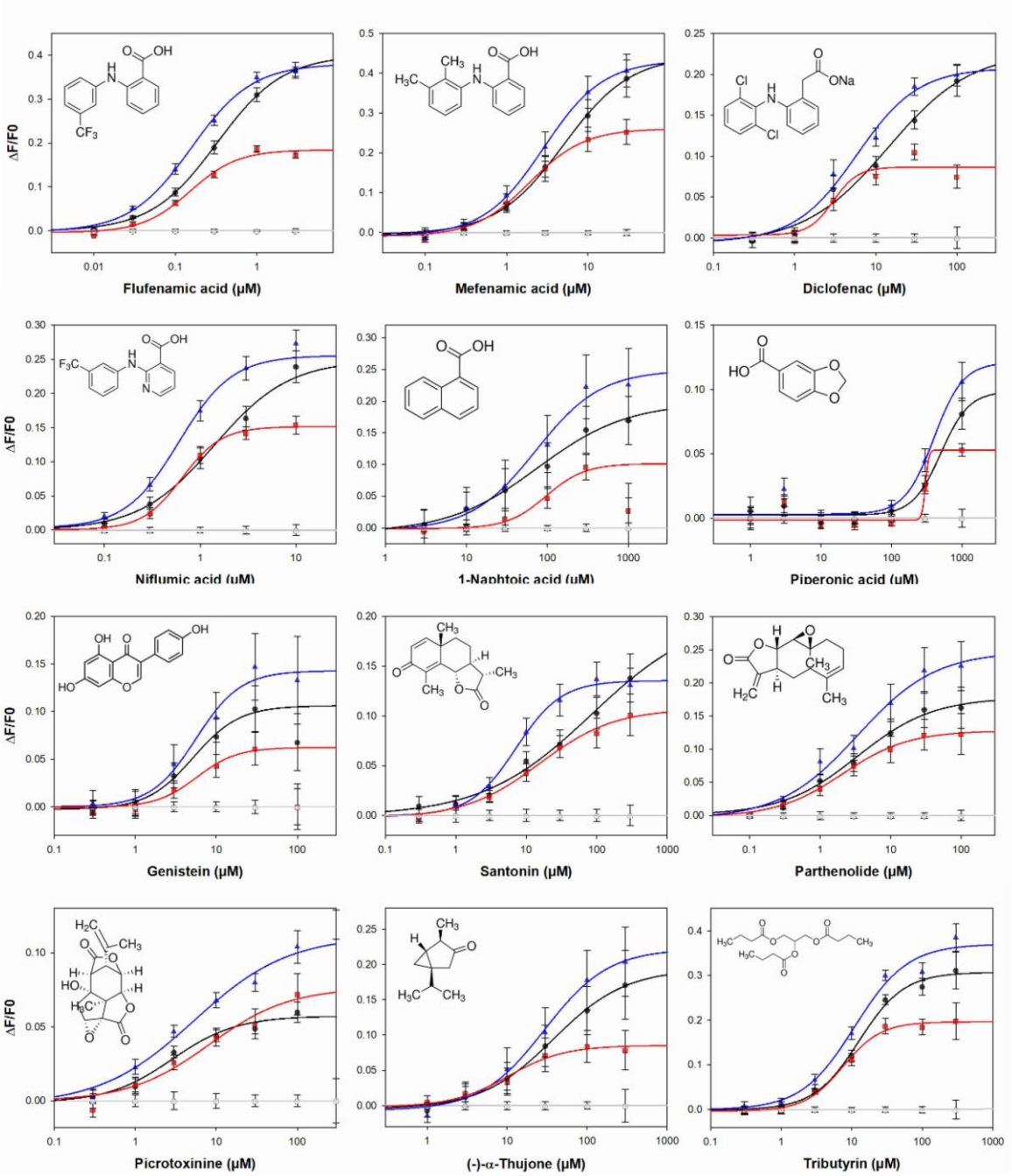

Figure 3. Dose-response relationships of TAS2R14 constructs transfected in HEK293T-Gα16gus44 cells stimulated with various bitter compounds. HEK 293T-Gα16gust44 cells were transiently transfected with vector #4: pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG (blue), vector pcDNA-FLAG-SST3-TAS2R14 (red) or control vector (C): pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV or empty vector pcDNA4/myc-HisA (grey). Agonist was automatically applied to the transfected cells, and fluorescence changes were monitored. The logarithmically scaled x-axis indicates the compound concentration in μM, and the y-axis shows the relative changes of fluorescence upon agonist application.

Functional expression of TAS2R14 showed a similar left shift of dose-response curves for pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG compared to control vector or pcDNA4-FLAG-SST3-hTAS2R14 construct, indicating enhancement in potency. For all tested bitter agonists, the effect on signal amplitude was strongly promoted with the enhancing transcriptional sequence (MAX) sequence and the presence of the FLAG epitope in the C-terminal position. The difference in maximal amplitude was also enhanced by the MAX sequence compared to the control vector pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV, even if it was enhanced regarding flufenamic acid, mefenamic acid, niflumic acid and diclofenac. Except for the isoflavone genistein and the two sesquiterpene lactones parthenolide and picrotoxinin, all the EC_{50} values were lower for pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG compared to the control vector pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV. Surprisingly, the basal TAS2R14 construct in pcDNA4 without the MAX sequence (pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14) led to an EC_{50} value close to pcDNA4-MAX or even weaker but with the lowest maximal amplitude. This short panel of tested ligands confirmed the enhancement of the functional response of the pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG construct for chemically diverse compounds.

Cell surface expression

To assess the cell surface expression of TAS2R14 using the different constructs, we transiently and individually transfected each vector into HEK293T-Gα16gus44 cells. After immunocytochemical staining, we observed, in epifluorescence microscopy, significant TAS2R14 expression for all gene constructs without significant differences (Supplemental Figure S2). Nevertheless, the staining of cells transfected by pcDNA4-MAX-mGluR5-hTAS2R14-FLAG showed accumulation of the receptor in the cytosol in the form of a fluorescent granule that suggests accumulation of the receptor within the Golgi compartment.

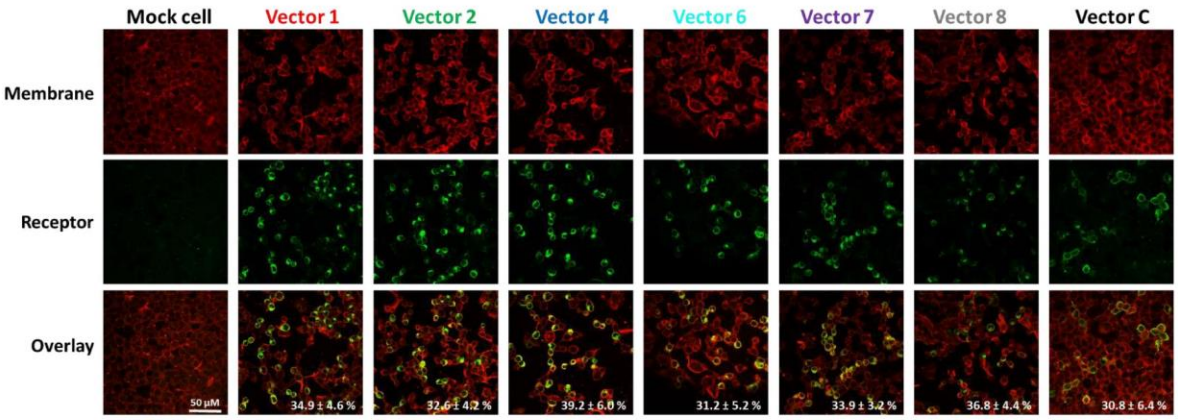

Figure 4. Cell-surface localization and expression rates of TAS2R14 constructs. Immunocytochemistry of HEK293T-Gα16gust44 cells expressing various FLAG-tagged and HSV-tagged TAS2R14 constructs. The TAS2R-expressing cells are shown in green, and the plasma membrane is stained in red. The receptors were detected using a primary anti-FLAG or anti-HSV antibody and fluorescently labelled by a secondary Alexa-488–conjugated antibody. All data were obtained from the same transfection experiment. HEK293T-Gα16gust44 cells in the absence of the TAS2R14 receptor showed no signal. Pictures were taken using a two-photon confocal microscope (Nikon A1-MP) equipped with a 60X objective lens (DImaCell platform, University of Burgundy, Dijon, France). The average cell fraction expressing the receptor (± SEM) is provided in white in the overlay panel. Four to six images were counted, and averaged per receptor construct pictures.

To validate cell plasma membrane surface expression and to investigate the reason for the decreased responsiveness of mGluR5-TAS2R14-FLAG, we observed immunocytochemical colocalization, as analysed using confocal microscopy. As shown in Figure 4, the merged image of immunofluorescence from the hTAS2R14 receptor (green) and plasma membrane (red) show colocalization for all FLAG-tagged constructs, except for the mGLuR5 signal peptide sequence (pcDNA4-MAX-mGluR5-hTAS2R14-FLAG). These results are in agreement with the absence of functional activity observed with pcDNA4-MAX-mGluR5-hTAS2R14, which can be attributed to the absence of membrane targeting.

Discussion

In the present study, we constructed an optimized construct for the functional expression of human TAS2R14 in HEK293 cells. To compare different constructs, we functionally expressed hTAS2R14 with added or exchanged DNA sequences that are well known to achieve this goal in other GPCRs. Insertion of the MAX sequence upstream of gene synthesis strongly improved the potency and efficacy of the receptor without increasing the level of measurable expression at the cell surface. The QBI SP163 translational element appeared to be a powerful tool to improve the functional expression of TAS2R. This element can also be used for other GPCRs. Indeed, we designed new constructs for the two subunits TAS1R2 and TAS1R3 that composed the heterodimeric sweet taste receptor and investigated their functional activity using cellular calcium-based assays with the two sweeteners, sucralose and neotame. Our results confirmed that TAS1R expression is also improved by this translational element (Figure 5, Table 3).

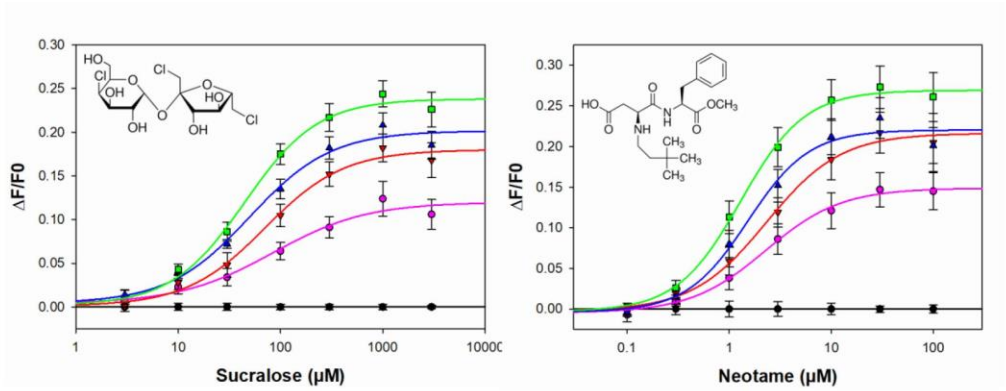

Figure 5. Dose-response relationship of sweet taste receptor stimulated with sucralose and neotame using TAS1R2 and TAS1R3 expressing vectors promoted by QBI SP163 translational enhancer sequence. HEK293T-Gα16gust44 cells were transiently co-transfected with vectors expressing each TAS1R2 and TAS1R3 subunit. Co-transfection of pcDNA3-TAS1R2 with pcDNA4-TAS1R3 (pink), or pcDNA3-MAX-TAS1R2 with pcDNA4-TAS1R3 (red) or pcDNA3-TAS1R2 with pcDNA4-MAX-TAS1R3 (blue) or pcDNA3-MAX-TAS1R2 with pcDNA4-MAX-TAS1R3 (green). Mocked cells respond to ligand (black). Agonists were automatically applied to the transfected cells, and fluorescence changes were monitored. The logarithmically scaled x-axis indicates the compound concentration in μM, and the y-axis shows the relative changes of fluorescence upon agonist application.

TAS1Rs construct	Sucralose				Neotame			
sequence	EC_{50} (µM)	x-fold	Maximal amplitude	(%)	EC_{50} (µM)	x-fold	Maximal amplitude	(%)
pcDNA3-TAS1R2 / pcDNA4-TAS1R3	84.13 ± 32.75	1.00	0.12 ± 0.01	100	2.28 ± 0.29	1.00	0.15 ± 0.01	100
pcDNA3-MAX-TAS1R2 / pcDNA4-TAS1R3	70.53 ± 13.43	1.19	0.18 ± 0.01	150	2.32 ± 0.32	0.98	0.22 ± 0.01	147
pcDNA3-TAS1R2 / pcDNA4-MAX-TAS1R3	49.82 ± 11.12	1.69	0.20 ± 0.01	167	1.52 ± 0.28	1.50	0.22 ± 0.01	147
pcDNA3-MAX-TAS1R2 / pcDNA4-MAX-TAS1R3	44.76 ± 6.15	1.88	0.24 ± 0.01	200	1.30 ± 0.13	1.75	0.27 ± 0.01	180

Table 3. EC_{50} values and maximal amplitude generated by the TAS1R2 and TAS1R3 constructs in response to 2 sweeteners.

We also observed that rat SST3, more than bovine Rho, favoured the functional expression of hTAS2R14 in HEK293T-Gα16gust44 cells in calcium imaging experiments. Finally, we found that FLAG epitope tag addition in the C-terminus can also improve receptor functionality, enabling reliable evaluation of cell surface expression by immunocytochemistry.

This work showed that while the SST1 receptor was largely maintained in intracellular vesicles, the SST3 receptor was targeted to the cell surface. The N-terminus has been clearly demonstrated to be responsible for the main difference in subcellular destination. Analysis of receptor chimaeras of SST1 and SST3 demonstrated that the first 65 amino acid residues of the N-terminal regions of SST3 are sufficient to obtain SST1 cell surface expression (Ammon *et al.* 2002). Then, these researchers used only the first 45 amino acids of the rat SST3 as a cell-surface-targeting signal at the N-terminus of bitter taste receptors (Bufe *et al.* 2002) and started deorphanizing the 25 human TAS2Rs (Meyerhof *et al.* 2010) (and all publications from Pr W. Meyerhof laboratory). The SST3 receptor still serves as a mechanistic model for understanding endosomal trafficking of GPCR and intracellular signalling (Tower-Gilchrist *et al.* 2014, War *et al.* 2011).
Other strategies have been used to enhance GPCR expression in heterologous systems (Tate and Grisshammer 1996). Among these strategies, the insertion of the rhodopsin N-terminal 20 amino acid residues was widely used to improve cell surface targeting of functional olfactory receptors (ORs) in the same cellular model (Krautwurst *et al.* 1998, Zhuang and Matsunami 2008). It was shown that the Rho-tag fusion fused to mouse ORs, as well as the FLAG-tag, generally leads to lower concentrations of agonist responses, thereby enhancing potency compared to HA-tagged or untagged ORs (Zhuang and Matsunami 2008). However, the authors showed that in cellular assays using OR transfection, increasing quantities of plasmid construction coding the OR during transfection contributes mainly to ligand specificity, suggesting that the quantity of cell-surface receptors, and not the Rho-tag, is involved in potency enhancement (Zhuang and Matsunami 2008). However, even with Rho-tag, many ORs still fail to reach the cell plasma membrane, and it was demonstrated that tags concatenation with the leucine-rich 17-amino acid signal peptide, such as Lucy-Rho-tag, in the N-terminal signal peptide could promote widespread OR surface expression (Shepard *et al.* 2013). Concerning the bitter taste receptor, the first chimaeric construct was obtained with the first 39 amino acids of bovine rhodopsin, analogously to OR, and led to very effective targeting to the cell surface of human TAS2R4 (Chandrashekar *et al.* 2000). The crystal structure resolution of rhodopsin demonstrated that the first 36 amino acids correspond to the extracellular domain (Palczewski *et al.* 2000). In the functional assay

presented in this study, the Rho-tag sequence, inserted in pcDNA4-MAX, was as effective in enhancing the TAS2R14 response compared to the control vector pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV, but the promoting effect with SST3 was more important in our own construct in pcDNA4-MAX.

We also used the FLAG-tag system to visualize TAS2R14 expression by immunostaining. FLAG-tag has become an extensively used tag system for identification, primarily for purification by a single-step procedure, of recombinant membrane proteins expressed in HEK cells (Chaudhary *et al.* 2011). Indeed, tags could overcome some difficulties in protein production by reducing aggregation, enhancing efficient translation, and increasing solubility. The small size, hydrophilic nature of sequence peptide, availability of high-affinity antibodies and ability to remove peptide via enterokinase cleavable sites make FLAG-tags essential biochemistry tools (Hopp *et al.* 1988, Loughran and Walls 2017, Malhotra 2009, Waugh 2005). The only drawback of the FLAG-tag could be a post-translational modification due to the tyrosine sulfation in the motif DYK that abolishes the FLAG-anti-FLAG interaction (Schmidt *et al.* 2012). In this study, we demonstrated that the C-terminal FLAG-tag position interfered less with TAS2R14 functionality than the FLAG located in the N-terminal position. It seemed that the N-terminus FLAG-tag upstream position decreased the ligand binding affinity of TAS2R14 with aristolochic acid. This finding might be explained by a possible disturbance on the extracellular site, also known as the vestibular site, involved in the binding process and recently brought to light by a molecular dynamic approach with TAS2R46 bitter taste receptor (Sandal *et al.* 2015) or odorant receptor (Bushdid *et al.* 2019). Inversely, the C-terminal position of the FLAG-tag leads to a weak enhancement in potency, which could be explained by a favourable coupling with protein G. Indeed, a recent study highlighted the crucial role of the conserved KLK/R motif in the cytoplasmic C-terminal region of TAS2R4 (Upadhyaya *et al.* 2015). Independent of the two highly conserved motifs in TM2 (LxxxR), inTM5 (LxxSL) or the 13 conserved residues shown to have critical roles in receptor activation (Pydi *et al.* 2014, Pydi *et al.* 2013), the author demonstrated by an alanine scan mutagenesis that the C-terminus KLK motif in TAS2R4 and, more precisely, the Lys300 of TAS2R4 is critical for receptor function and that basic and hydrophobic amino acid residues are important for trafficking and activation (Upadhyaya *et al.* 2015). Compared to TAS2R4, TAS2R14 is composed of 35 amino acids in the C-terminus, and FLAG-tag added negatively charged residues, which could promote interaction with the G protein. The first full-length structure of the GPCR/G protein interface obtained for the β2-AR-G_s complex demonstrated that 20 amino acids in the C-terminus of Gs are strongly involved in agonist affinity (Rasmussen *et al.* 2011). Thus far, the dynamic interaction mechanism between receptor and G protein subtype selectivity still requires more experiment to clearly understand coupling specificity. However, a recent study that tethered β2-AR and different Gαs terminus peptides demonstrated that even in the control sequence, the presence of the ER/K polylinker 1- alone at the C-terminal of the GPCR, 2- between the two protein domains, or 3- the use of scrambled peptide instead of Gs peptide or Gq peptide systematically increased receptor activity (Gupte *et al.* 2017). Thus, we hypothesized that the eight amino acids added by FLAG-tag in the C-terminus of TAS2R14 weakly contribute to enhancing its activity through structural stabilization of coupling active interactions between the receptor and endogenous G protein.

Other approaches have been investigated to improve TAS2R functionality, such as the role of accessory proteins serving as chaperones. Thus, the influence of the receptor transporting protein RTP and the receptor enhancing protein Reep have been evaluated (Behrens *et al.* 2006). Indeed, it has been

previously shown that co-expression of RTP1, RTP2 and Reep1 can improve OR functionality(Saito *et al.* 2004), as well as the shorter form of RTP1 (RTP1S) (Wu *et al.* 2012, Zhuang and Matsunami 2007) or the Myr-Ric-8A (Yoshikawa and Touhara 2009) and Ric-8B proteins (Von Dannecker *et al.* 2005, Von Dannecker *et al.* 2006). Behrens and collaborators demonstrated that the introduction of RTP3 and RTP4 can influence cell surface trafficking and increase amounts of TAS2R16 receptor by 4-fold to 3-fold, respectively, leading to significant amplification of TAS2R-mediated signal transduction of the bitter taste receptor TAS2R16 (Behrens *et al.* 2006). Interestingly, RT-PCR analysis of HEK293T-Gα16gust44 revealed endogenous expression of RTP and REEP genes. Interestingly, heterologous expression of the sweet taste receptor TAS1R2/TAS1R3 and the bitter taste receptors TAS2R16 and TAS2R44 was enhanced by REEP2 due to the recruitment of the receptor to lipid raft microdomains (Ilegems *et al.* 2010).

Finally, the ability of the receptor to reach the cell surface may be affected by glycosylation. Similar to many cell surface proteins, TAS2R receptors are glycosylated on Asn. Sequence alignment of TAS2R has shown that the Asn-linked glycosylation residue in a conserved sequence of ECL2 is conserved among all 25 hTAS2Rs. Mutation of this conserved sequence decreases receptor surface expression (Reichling *et al.* 2008).

In conclusion, the aim of our work was to demonstrate the importance of the initial construction of GPCR to functionally express them in large amounts, targeting the cell surface and promoting the active state in a heterologous HEK293 cell line. Additionally, many other technical parameters, such as cell seeding, transfection reagent or quantity of DNA transfected, are involved in GPCR expression in cell lines and should be explored to optimize functional expression in cell-based assays.

References

Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell, 100*(6), pp. 693-702.

Ammon, C., Schafer, J., Kreuzer, O. J. and Meyerhof, W. (2002) Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem, 110*(1-2), pp. 137-45.

Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Pinacho, R., Haro, J. M., Ramos, B. and Ferrer, I. (2015) Decrease in olfactory and taste receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia. *J Psychiatr Res, 60*, pp. 109-16.

Behrens, M., Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C. and Meyerhof, W. (2006) Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem, 281*(29), pp. 20650-9.

Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M. and Meyerhof, W. (2004) The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun, 319*(2), pp. 479-85.

Behrens, M. and Meyerhof, W. (2010) Oral and extraoral bitter taste receptors. *Results Probl Cell Differ, 52*, pp. 87-99.

Behrens, M. and Meyerhof, W. (2011) Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav, 105*(1), pp. 4-13.

Briand, L. and Salles, C. (2016) Taste perception and integration. in *Flavor: From Food to Behaviors, Wellbeing and Health*: Elsevier Ltd. pp. 460 p.

Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J. D. and Meyerhof, W. (2002) The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet, 32*(3), pp. 397-401.

Bushdid, C., de March, C. A., Topin, J., Do, M., Matsunami, H. and Golebiowski, J. (2019) Mammalian class I odorant receptors exhibit a conserved vestibular-binding pocket. *76*(5), pp. 995-1004.

Campa, D., Vodicka, P., Pardini, B., Naccarati, A., Carrai, M., Vodickova, L., Novotny, J., Hemminki, K., Forsti, A., Barale, R. and Canzian, F. (2010) A gene-wide investigation on polymorphisms in the taste receptor 2R14 (TAS2R14) and susceptibility to colorectal cancer. *BMC Med Genet, 11*, pp. 88.

Chamoun, E., Carroll, N. A., Duizer, L. M., Qi, W., Feng, Z. and Darlington, G. (2018) The Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms in Taste Receptor Genes, Taste Function and Dietary Intake in Preschool-Aged Children and Adults in the Guelph Family Health Study. *10*(8).

Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S. and Ryba, N. J. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell, 100*(6), pp. 703-11.

Chaudhary, S., Pak, J. E., Pedersen, B. P., Bang, L. J., Zhang, L. B., Ngaw, S. M., Green, R. G., Sharma, V. and Stroud, R. M. (2011) Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected Human Embryonic Kidney 293S cells. *Methods, 55*(4), pp. 273-80.

Chen, M. C., Wu, S. V., Reeve, J. R., Jr. and Rozengurt, E. (2006) Bitter stimuli induce Ca2+ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca2+ channels. *Am J Physiol Cell Physiol, 291*(4), pp. C726-39.

Clark, A. A., Dotson, C. D., Elson, A. E., Voigt, A., Boehm, U., Meyerhof, W., Steinle, N. I. and Munger, S. D. (2015) TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *Faseb j, 29*(1), pp. 164-72.

Deshpande, D. A., Wang, W. C., McIlmoyle, E. L., Robinett, K. S., Schillinger, R. M., An, S. S., Sham, J. S. and Liggett, S. B. (2010) Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med, 16*(11), pp. 1299-304.

Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y. K., Vigues, S., Ott, S. H., Elson, A. E., Choi, H. J., Shaw, H., Egan, J. M., Mitchell, B. D., Li, X., Steinle, N. I. and Munger, S. D. (2008) Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One, 3*(12), pp. e3974.

Einhauer, A. and Jungbauer, A. (2001a) Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide. *J Chromatogr A, 921*(1), pp. 25-30.

Einhauer, A. and Jungbauer, A. (2001b) The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods, 49*(1-3), pp. 455-65.

Finger, T. E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H. and Silver, W. L. (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(15), pp. 8981-6.

Foster, S. R., Porrello, E. R., Purdue, B., Chan, H. W., Voigt, A., Frenzel, S., Hannan, R. D., Moritz, K. M., Simmons, D. G., Molenaar, P., Roura, E., Boehm, U., Meyerhof, W. and Thomas, W. G. (2013) Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One, 8*(5), pp. e64579.

Gaida, M. M., Mayer, C., Dapunt, U., Stegmaier, S., Schirmacher, P., Wabnitz, G. H. and Hansch, G. M. (2016) Expression of the bitter receptor T2R38 in pancreatic cancer: localization in lipid droplets and activation by a bacteria-derived quorum-sensing molecule. *Oncotarget, 7*(11), pp. 12623-32.

Gupte, T. M., Malik, R. U., Sommese, R. F., Ritt, M. and Sivaramakrishnan, S. (2017) Priming GPCR signaling through the synergistic effect of two G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A, 114*(14), pp. 3756-3761.

Hariri, B. M., McMahon, D. B., Chen, B., Freund, J. R., Mansfield, C. J., Doghramji, L. J., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Kennedy, D. W., Reed, D. R., Jiang, P. and Lee, R. J. (2017) Flavones modulate respiratory epithelial innate immunity: Anti-inflammatory effects and activation of the T2R14 receptor. *292*(20), pp. 8484-8497.

Herrera Moro Chao, D., Argmann, C., Van Eijk, M., Boot, R. G., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Foppen, E., Siljee, J. E., Unmehopa, U. A., Kalsbeek, A. and Aerts, J. M. (2016) Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. *Sci Rep, 6*, pp. 29094.

Hofer, D., Puschel, B. and Drenckhahn, D. (1996) Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(13), pp. 6631-4.

Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., Urdal, D. L. and Conlon, P. J. (1988) A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/technology (Nature Publishing Company), 6*, pp. 1204-1210.

Ilegems, E., Iwatsuki, K., Kokrashvili, Z., Benard, O., Ninomiya, Y. and Margolskee, R. F. (2010) REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J Neurosci, 30*(41), pp. 13774-83.

Jacobsen, S. E., Gether, U. and Brauner-Osborne, H. (2017) Investigating the molecular mechanism of positive and negative allosteric modulators in the calcium-sensing receptor dimer. *Sci Rep, 7*, pp. 46355.

Jang, H. J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M. J., Carlson, O. D., Kim, B. J., Zhou, J., Kim, H. H., Xu, X., Chan, S. L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R. F. and Egan, J. M. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(38), pp. 15069-74.

Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P. J., Thijs, T., Tack, J. and Depoortere, I. (2011) Bitter taste receptors and alpha-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(5), pp. 2094-9.

Kaji, I., Karaki, S., Fukami, Y., Terasaki, M. and Kuwahara, A. (2009) Secretory effects of a luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 296*(5), pp. G971-81.

Kinnamon, S. C. (2012) Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf), 204*(2), pp. 158-68.

Krautwurst, D., Yau, K. W. and Reed, R. R. (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell, 95*(7), pp. 917-26.

Lee, R. J. and Cohen, N. A. (2015) Taste receptors in innate immunity. *Cell Mol Life Sci, 72*(2), pp. 217-36.

Lee, R. J., Xiong, G., Kofonow, J. M., Chen, B., Lysenko, A., Jiang, P., Abraham, V., Doghramji, L., Adappa, N. D., Palmer, J. N., Kennedy, D. W., Beauchamp, G. K., Doulias, P. T., Ischiropoulos, H., Kreindler, J. L., Reed, D.

R. and Cohen, N. A. (2012) T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest, 122*(11), pp. 4145-59.
Levit, A., Nowak, S., Peters, M., Wiener, A., Meyerhof, W., Behrens, M. and Niv, M. Y. (2014) The bitter pill: clinical drugs that activate the human bitter taste receptor TAS2R14. *Faseb j, 28*(3), pp. 1181-97.
Li, F. (2013) Taste perception: from the tongue to the testis. *Mol Hum Reprod, 19*(6), pp. 349-60.
Loughran, S. T. and Walls, D. (2017) Tagging Recombinant Proteins to Enhance Solubility and Aid Purification. *Methods Mol Biol, 1485*, pp. 131-156.
Lu, P. and Zhang, C. H. (2017) Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *149*(2), pp. 181-197.
Lund, T. C., Kobs, A. J., Kramer, A., Nyquist, M., Kuroki, M. T., Osborn, J., Lidke, D. S., Low-Nam, S. T., Blazar, B. R. and Tolar, J. (2013) Bone marrow stromal and vascular smooth muscle cells have chemosensory capacity via bitter taste receptor expression. *PLoS One, 8*(3), pp. e58945.
Malhotra, A. (2009) Tagging for protein expression. *Methods Enzymol, 463*, pp. 239-58.
Martin, L. T. P., Nachtigal, M. W., Selman, T., Nguyen, E., Salsman, J., Dellaire, G. and Dupre, D. J. (2019) Bitter taste receptors are expressed in human epithelial ovarian and prostate cancers cells and noscapine stimulation impacts cell survival. *454*(1-2), pp. 203-214.
Matsunami, H., Montmayeur, J. P. and Buck, L. B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature, 404*(6778), pp. 601-4.
Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G. and Behrens, M. (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses, 35*(2), pp. 157-70.
Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H. and Buck, L. B. (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci, 4*(5), pp. 492-8.
Nissim, I., Dagan-Wiener, A. and Niv, M. Y. (2017) The taste of toxicity: A quantitative analysis of bitter and toxic molecules. *69*(12), pp. 938-946.
Nowak, S., Di Pizio, A., Levit, A., Niv, M. Y., Meyerhof, W. and Behrens, M. (2018) Reengineering the ligand sensitivity of the broadly tuned human bitter taste receptor TAS2R14. *Biochim Biophys Acta Gen Subj, 1862*(10), pp. 2162-2173.
Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science, 289*(5480), pp. 739-45.
Pydi, S. P., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2014) Constitutive activity of bitter taste receptors (T2Rs). *Adv Pharmacol, 70*, pp. 303-26.
Pydi, S. P., Chakraborty, R., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2013) Role of rhodopsin N-terminus in structure and function of rhodopsin-bitter taste receptor chimeras. *Biochem Biophys Res Commun, 430*(1), pp. 179-82.
Raliou, M., Grauso, M., Hoffmann, B., Schlegel-Le-Poupon, C., Nespoulous, C., Debat, H., Belloir, C., Wiencis, A., Sigoillot, M., Bano, S. P., Trotier, D., Pernollet, J. C., Montmayeur, J. P., Faurion, A. and Briand, L. (2011) Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. *Chem Senses, 36*(6), pp. 527-37.
Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K. and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature, 477*(7366), pp. 549-55.
Reed, D. R., Tanaka, T. and McDaniel, A. H. (2006) Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiol Behav, 88*(3), pp. 215-26.
Reichling, C., Meyerhof, W. and Behrens, M. (2008) Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation. *J Neurochem, 106*(3), pp. 1138-48.
Reszka, E., Nowakowska-Świrta, E., Kupczyk, M., Dudek, W. and Świerczyńska-Machura, D. (2015) Expression of Bitter Taste Receptors in the Human Skin In Vitro. in.
Roper, S. D. (2013) Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Semin Cell Dev Biol, 24*(1), pp. 71-9.
Roudnitzky, N., Behrens, M., Engel, A., Kohl, S., Thalmann, S., Hubner, S., Lossow, K., Wooding, S. P. and Meyerhof, W. (2015) Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *PLoS Genet, 11*(9), pp. e1005530.
Saito, H., Kubota, M., Roberts, R. W., Chi, Q. and Matsunami, H. (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell, 119*(5), pp. 679-91.
Sandal, M., Behrens, M., Brockhoff, A., Musiani, F., Giorgetti, A., Carloni, P. and Meyerhof, W. (2015) Evidence for a Transient Additional Ligand Binding Site in the TAS2R46 Bitter Taste Receptor. *J Chem Theory Comput, 11*(9), pp. 4439-49.
Schmidt, P. M., Sparrow, L. G., Attwood, R. M., Xiao, X., Adams, T. E. and McKimm-Breschkin, J. L. (2012) Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system. *PLoS One, 7*(6), pp. e37779.
Shah, A. S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T. O., Kline, J. N. and Welsh, M. J. (2009) Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science, 325*(5944), pp. 1131-4.
Shaik, F. A., Singh, N., Arakawa, M., Duan, K., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2016) Bitter taste receptors: Extraoral roles in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*.
Shaw, L., Mansfield, C., Colquitt, L., Lin, C., Ferreira, J., Emmetsberger, J. and Reed, D. R. (2018) Personalized expression of bitter 'taste' receptors in human skin. *PLoS One, 13*(10), pp. e0205322.

Shepard, B. D., Natarajan, N., Protzko, R. J., Acres, O. W. and Pluznick, J. L. (2013) A cleavable N-terminal signal peptide promotes widespread olfactory receptor surface expression in HEK293T cells. *PLoS One, 8*(7), pp. e68758.

Singh, N., Chakraborty, R., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2014) Differential expression of bitter taste receptors in non-cancerous breast epithelial and breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun, 446*(2), pp. 499-503.

Singh, N., Vrontakis, M., Parkinson, F. and Chelikani, P. (2011) Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochem Biophys Res Commun, 406*(1), pp. 146-51.

Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z. and Keshet, E. (1998) Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol, 18*(6), pp. 3112-9.

Tate, C. G. and Grisshammer, R. (1996) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol, 14*(11), pp. 426-30.

Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., Churchill, M. E., Silver, W. L., Kinnamon, S. C. and Finger, T. E. (2010) Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(7), pp. 3210-5.

Tower-Gilchrist, C., Styers, M. L., Yoder, B. K., Berbari, N. F. and Sztul, E. (2014) Monitoring endosomal trafficking of the g protein-coupled receptor somatostatin receptor 3. *Methods Enzymol, 534*, pp. 261-80.

Ueda, T., Ugawa, S., Ishida, Y., Shibata, Y., Murakami, S. and Shimada, S. (2001) Identification of coding single-nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting. *Biochem Biophys Res Commun, 285*(1), pp. 147-51.

Ueda, T., Ugawa, S., Yamamura, H., Imaizumi, Y. and Shimada, S. (2003) Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci, 23*(19), pp. 7376-80.

Upadhyaya, J., Singh, N., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2015) The structure-function role of C-terminus in human bitter taste receptor T2R4 signaling. *Biochim Biophys Acta, 1848*(7), pp. 1502-8.

Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F. and Malnic, B. (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. *J Neurosci, 25*(15), pp. 3793-800.

Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F. and Malnic, B. (2006) Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(24), pp. 9310-4.

War, S. A., Somvanshi, R. K. and Kumar, U. (2011) Somatostatin receptor-3 mediated intracellular signaling and apoptosis is regulated by its cytoplasmic terminal. *Biochim Biophys Acta, 1813*(3), pp. 390-402.

Waugh, D. S. (2005) Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol, 23*(6), pp. 316-20.

Wellendorph, P., Burhenne, N., Christiansen, B., Walter, B., Schmale, H. and Brauner-Osborne, H. (2007) The rat GPRC6A: cloning and characterization. *Gene, 396*(2), pp. 257-67.

Wolfle, U., Elsholz, F. A., Kersten, A., Haarhaus, B., Muller, W. E. and Schempp, C. M. (2015) Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol, 28*(3), pp. 137-46.

Wu, L., Pan, Y., Chen, G. Q., Matsunami, H. and Zhuang, H. (2012) Receptor-transporting protein 1 short (RTP1S) mediates translocation and activation of odorant receptors by acting through multiple steps. *J Biol Chem, 287*(26), pp. 22287-94.

Yoshikawa, K. and Touhara, K. (2009) Myr-Ric-8A enhances G(alpha15)-mediated Ca2+ response of vertebrate olfactory receptors. *Chem Senses, 34*(1), pp. 15-23.

Zhang, Y., Wang, X., Li, X., Peng, S., Wang, S., Huang, C. Z., Huang, C. Z., Zhang, Q., Li, D., Jiang, J., Ouyang, Q., Zhang, Y., Li, S. and Qiao, Y. (2017) Identification of a specific agonist of human TAS2R14 from Radix Bupleuri through virtual screening, functional evaluation and binding studies. *Sci Rep, 7*(1), pp. 12174.

Zheng, K., Lu, P., Delpapa, E., Bellve, K., Deng, R., Condon, J. C., Fogarty, K., Lifshitz, L. M., Simas, T. A. M., Shi, F. and ZhuGe, R. (2017) Bitter taste receptors as targets for tocolytics in preterm labor therapy. *Faseb j, 31*(9), pp. 4037-4052.

Zhuang, H. and Matsunami, H. (2007) Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *J Biol Chem, 282*(20), pp. 15284-93.

Zhuang, H. and Matsunami, H. (2008) Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. *Nat Protoc, 3*(9), pp. 1402-13.

Supplemental data

Figure S1. Amino acid sequences of hTAS2R14 constructs used in the present study.

Vector #1: pcDNA4-FLAG-SST3-TAS2R14

M**DYKDDDDK**AAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSGGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIA
LVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFL
KIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLS
LAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSC
HSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS

Vector #2: pcDNA4-MAX-FLAG-SST3-TAS2R14

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCM**DYKDDDDK**AAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSGGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLG
NSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLG
TFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFI
PFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGM
AYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS

Vector #3: pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMAAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSGGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCI
DWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANF
SNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFL
LLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVL
ILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS

Vector #4: pcDNA4-MAX-SST3-TAS2R14-FLAG

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMAAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSGGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCI
DWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANF
SNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFL
LLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVL
ILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS**DYKDDDDK**

Vector #5: pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPWQGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKI
SSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLK
WRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWK
HRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLR
QASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS

Vector #6: pcDNA4-MAX-Rho-TAS2R14-FLAG

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPWQGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKI
SSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLK

WRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWK
HRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLR
QASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS**DYKDDDDK**

Vector #7: pcDNA4-MAX-Igκ-SST3-TAS2R14-FLAG

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMETDTLLLWVLLLWVPGSTGEAAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTSLGNASAGTSLAGLAVSGGGVIKSIFT
FVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVIN
HFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFS
SLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEE
NLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHKEFRESS**DYKDDDDK**

Vector #8: pcDNA4-MAX-mGluR5-TAS2R14-FLAG

AGCGCAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTCCAGAAGGGAGAGGAGCCCGCCA
AGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCG
AAACCMVLLLILSVLLLKEDVRGSAGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLI
FGSWCVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFL
NIALINIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKA
HRGVKSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEP
SGHKEFRESS**DYKDDDDK**

Vector control (C): pcDNA5/FRT-SST3-TAS2R14-HSV

MVLLLILSVLLLKEDVRGSAGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRISLVWLIFGSW
CVSVFFPALFATEKMFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVTSVFLFLNIALI
NIHINASINGYRRNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISGDASTKAHRGV
KSVITFFLLYAIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLRYMFKDGEPSGHK
EFRESS**QPELAPEDPEDC**

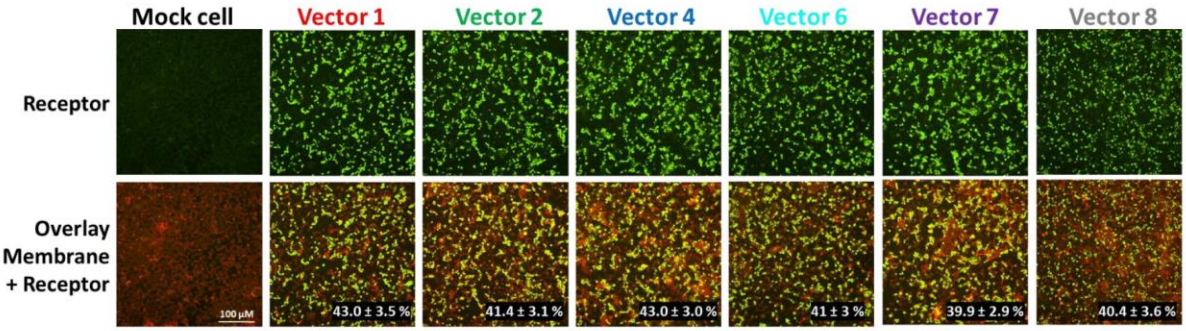

Figure S2. Immunocytochemical analyses of TAS2R14 constructs. To identify expression differences among FLAG-tagged constructs. cDNA was transiently transfected into HEK 293T-Gα16gust44 cells and subjected to immunocytochemical analyses. The receptor (green) was visualized using an antibody specific for the FLAG-tag, and the cell surface (red) was detected using concanavalin A. The TAS2R14 construct is specified by its vector number. The average cell fraction expressing the receptor (± SEM) is provided in white in the overlay panel. Four to six images were counted, and averaged per receptor construct pictures were taken on a Nikon TiE with a 20X SFluor objective lens with a cooled EMCCD camera and constant exposure time.

Partie 3 :

Conclusion et perspectives

I. Etat de l'art au début de ma thèse de doctorat

Il est communément admis que le travail avec des RCPGs peut se révéler délicat, voir représenter un véritable challenge. En effet, leur expression et surexpression, purification, stabilisation et cristallisation sont toujours difficiles. Pour cela, différents systèmes d'expression ont été développés pour la production de RCPG utilisant : bactéries, levures, cellules d'insectes, lignées cellulaires de mammifères, oocytes de Xenope et système acellulaire.

Notre équipe s'intéresse depuis plus de 15 ans aux mécanismes moléculaires qui sous-tendent la perception chimiosensoriels de molécules sapides et odorantes responsables de la flaveur des aliments. Nous étudions les récepteurs gustatifs (Maitrepierre *et al.* 2012, Maitrepierre *et al.* 2013) et olfactifs (Behrens *et al.* 2018, Belloir *et al.* 2017a), ainsi que certaines protéines sucrées telles que la brazzéine (Poirier *et al.* 2012) et la monelline, ou modificatrices du goût comme la miraculine et la gurmarine (Sigoillot *et al.* 2012, Sigoillot *et al.* 2018). Nous étudions également l'impact de protéines qui agissent en périphérie des récepteurs (protéines de liaison aux odorants, enzymes du métabolisme des odorants) sur la perception gustative et olfactive (Heydel *et al.* 2013, Heydel *et al.* 2019).

Concernant plus particulièrement la gustation et les récepteurs gustatifs, les premiers travaux menés par notre laboratoire ont porté sur l'expression des DNT des sous-unités TAS1R1, TAS1R2 et TAS1R3 chez l'homme et la souris. Les résultats ont fait l'objet de trois thèses soutenues en 2010, 2011 et 2016. L'approche retenue a été l'expression recombinante des TAS1R-DNT à l'aide de la bactérie *E. coli* sous forme de corps d'inclusion. Cette stratégie offre différents avantages : l'expression en corps d'inclusion n'est pas toxique pour la bactérie, elle permet des niveaux d'expression souvent élevés et constitue une première étape de purification. L'expression est également rapide et peu coûteuse. La production en bactéries avait déjà été utilisée avec succès (Nie *et al.* 2006, Nie *et al.* 2005) afin d'obtenir les DNT de TAS1R2 et TAS1R3 (mTAS1R2-DNT et mTAS1R3-DNT) murins fonctionnels en absence de modifications post-traductionnelles. Cependant, dans ces études, les protéines étaient produites en très faibles quantités sous forme soluble. De plus, la sous-unité mTAS1R2-DNT n'avait été obtenue que sous forme soluble grâce à la protéine de fusion maltose-binding protein (MBP), qui a l'inconvénient elle aussi de lier des molécules sucrées.

Dès l'initiation des recherches en 2007, une stratégie différente a été utilisée pour faciliter la purification des protéines recombinantes. Les travaux des deux premières thèses ont été initiés par des expériences de biologie moléculaire pour la préparation des constructions plasmidiques codant les cDNA des DNT des TAS1R-. Ces travaux ont été suivis par la mise au point des conditions de cultures et d'induction de la production des protéines recombinantes. Les TAS1R-DNT ont été obtenus sous forme de CI, à plus de 100 mg de

protéines par litre de culture, facilement purifiables par différentes étapes de lavage et de centrifugation. Les premières difficultés ont été la mise au point des étapes de repliement pour obtenir une protéine pure et fonctionnelle. Initialement, les CI étaient lavés à l'urée puis solubilisés dans du chlorure de guanidine avant d'être repliés par dialyse successive dans différents tampons. La recherche du tampon optimal a été réalisée par criblage de différentes solutions induisant des changements de pH, des quantités variables de sels, la présence d'agents chaotrope (urée), de ligands, d'additifs polaires (arginine, glucose, glycérol), de différents détergents. Le détergent zwitterionique Zw3-14 avait montré le plus d'impact positif sur le repliement (Maitrepierre *et al.* 2012, Maitrepierre *et al.* 2013) puis était échangé par le DDM. Les premières mesures d'interactions avec les molécules sapides ont pu ainsi être réalisées. Différents essais de marquage par des sondes fluorescentes ont été réalisés pour amplifier le signal mesuré, mais se sont révélées infructueuses, la greffe de la sonde sur le DNT conduisant à son inactivation. Les premières mesures d'activité ont donc finalement été obtenues par spectroscopie de fluorescence intrinsèque des tryptophanes ou par microcalorimétrie, deux méthodes ne nécessitant pas de marquage. Ainsi, une valeur de K_d de 2 mM pour hTAS1R3-DNT a été mesurée par fluorescence intrinsèque. L'affinité mesurée pour la sous-unité hTAS1R1-DNT envers le MSG a été évaluée par microcalorimétrie et le modèle à deux sites de fixation a permis de déterminer des K_d de 715 µM et 8 mM.

Par la suite, des investigations supplémentaires ont été menées pour obtenir le DNT de TAS1R2 sous forme soluble sur la base des travaux de Nie et collaborateurs (Nie *et al.* 2006, Nie *et al.* 2005). L'abaissement de la température de croissance des bactéries lors de la phase de synthèse de la protéine recombinante et la diminution des concentrations d'IPTG sont deux facteurs majeurs connus pour favoriser l'expression soluble de la protéine d'intérêt. Malheureusement après 6 mois d'expérimentations et l'obtention à priori de quantité relativement élevée de protéines solubles, les analyses ont montré que la majorité de la protéine purifiée était composé de protéine chaperones d'*E. coli* (majoritairemnt, GroEL).

C'est à cette étape que j'ai eu en charge de (re)mettre en place le protocole de repliement pour l'étude du récepteur umami du chat et plus particulièrement pour l'étude de la sous-unité cTAS1R1-DNT (Belloir *et al.* 2017b). J'ai profité de cette occasion, de mes recherches bibliographiques et des connaissances acquises lors du Workshop Amphipols 2013, pour apporter quelques modifications au protocole de repliement. Les principaux changements ont porté sur : (1) la substitution du chlorure de guanidine par l'urée lors de la production des CI avec leur congélation sous forme de culots secs prêts à l'emploi, (2) l'addition de fortes concentrations de SDS (20 mM) dans l'étape de solubilisation des CI afin de déplier de façon homogène la protéine agrégée, (3) l'addition de forte concentration de détergent DDM (5 mM) largement supérieur à la CMC afin de maintenir un environnement

favorable au niveau des zones hydrophobes de la protéine, (4) l'addition de forte concentration de KCl (> 300 mM) pour précipiter fortement et rapidement le SDS au début de l'étape de repliement par dialyse. Ces différents paramètres combinés ont permis d'obtenir le DNT de cTAS1R1 correctement replié et fonctionnel. Les interactions du cTAS1R1-DNT ont été mesurée par fluorescence intrinsèque des tryptophanes pour différents acides aminés et l'IMP (Belloir *et al.* 2017b).

Parallèlement, ce nouveau protocole a été appliqué avec succès au repliement de TAS1R2-DNT produit à partir des CI dans le cadre des travaux de thèse d'Anni Laffitte. Les études d'interactions de TAS1R2-DNT avec plusieurs ligands sucrés naturels ou de synthèse ont révélé des affinités de l'ordre du millimolaire pour le glucose, sucrose et fructose, et du micromolaire pour différents édulcorants tels que le sucralose, l'acesulfame K, la saccharine, le néotame et l'alitame. Trois mutants connus ont été générés par mutagénèse dirigée pour étudier la substitution d'acides aminés précis dans le site orthostérique. Les résultats ont montré que TAS1R2-DNT-D278A lie l'aspartame mais pas le sucralose, TAS1R2-DNT-E302A ne lie ni le sucralose ni l'aspartame, TAS1R2-DNT-E382A lie le sucralose mais pas l'aspartame, confirmant l'importance de ces résidus au niveau du site de liaison (Laffitte *et al.* in preparation). Par conséquent, la production de TAS1R-DNT était devenue un protocole de « routine » au laboratoire.

C'est à cette époque aussi que j'ai commencé ma thèse de doctorat avec pour objectif d'étudier les récepteurs chimiosensoriels. Initialement orientés vers les récepteurs olfactifs et gustatifs, j'ai rapidement limité mon sujet aux récepteurs gustatifs. Le projet de thèse inclut plusieurs axes comprenant (1) étudier la contribution de chaque sous-unité constituant le DNT du récepteur au goût umami chez l'Homme, (2) élargir nos approches en explorant la production du récepteur humain au goût sucré en cellules de mammifères et (3) développer des tests cellulaires *in vitro* permettant de mesurer en temps réel l'activité des récepteurs gustatifs humains par imagerie calcique sur cellules vivantes.

II. Etude de DNT de TAS1R1 et TAS1R3 produits en *E. coli*

II.1. Travaux accomplis

Afin d'améliorer la purification des TAS1R-DNT, de nouveaux protocoles ont été comparés. Deux stratégies différentes ont été réalisées pour la purification. La première méthode a consisté à utiliser les étiquettes His-tag présentes sur les protéines recombinantes. La deuxième méthode était basée sur l'utilisation de la protéine de fusion SUMO (small ubiquitin modifying protein) en partie N-terminale du TAS1R2-DNT. Cette deuxième approche présente également l'avantage d'augmener la quantité de protéine sous forme soluble et donc

par conséquent de s'affranchir des étapes de repliements précédemment liées à la production des récepteurs sous forme de CI (Wingfield 2015).

La première approche a consisté à intégrer une étape de chromatographie IMAC au protocole de repliement précédemment utilisé pour le cTAS1R1-DNT et le hTAS1R2-DNT afin d'améliorer la pureté de la protéine. En effet, le procédé de repliement sur colonne est particulièrement avantageux, car il permet d'empêcher les particules de s'agréger tout en purifiant simultanément la protéine d'intérêt. L'inconvénient d'une telle approche est l'orientation relative de chaque monomère dans la résine et un éventuel obstacle stérique empêchant un repliement réussi (Tsumoto *et al.* 2003). Quelques essais ont d'abord été tentés pour replier directement les protéines solubilisées dans l'urée en les fixant dès la première étape sur les colonnes His-tag. Cependant ces premières tentatives ont conduit à un échec avec le colmatage de la résine sous l'impact des concentrations très élevées d'urée et de SDS dans les tampons initiaux de solubilisation. Par la suite, l'étape de chromatographie IMAC a été réalisée après les étapes de dialyse. Afin de favoriser un accrochage efficace de la protéine, il est courant de faire circuler l'échantillon en boucle sur la colonne. Les résultats montrèrent qu'une majorité de la protéine n'était finalement pas retenue sur la colonne IMAC même après 24 heures d'injection. Les deux fractions récoltées (retenue et non retenue par la colonne) ont été concentrées et injectées sur la résine d'exclusion stérique. De façon surprenante, il s'est avéré que la protéine contenue dans la fraction retenue par la colonne IMAC était principalement sous forme agrégée alors que la fraction non retenue révélait une proportion importante de protéine correctement repliée avec l'obtention d'un pic majoritaire de faible poids moléculaire apparent, symétrique en gel filtration. L' hypothèse que nous pouvons émettre est que lorsque la protéine est repliée, les étiquettes His-tag situées en position N- et C-terminale ne sont pas accessibles, soit parce qu'elles sont liées à une conformation de la protéine qui empêche leur accessibilité, soit parce qu'elles sont masquées par le détergent qui englobe les zones hydrophobes de la protéine. A l'inverse, lorsque la protéine est mal repliée ou agrégée les étiquettes sont libres et interagissent avec le nickel des colonnes IMAC.

Par conséquent, la stratégie de repliement des DNT a été changée en intégrant cette nouvelle étape d'IMAC « inversée » pour l'étude des DNT du récepteur au goût umami. Dans l'ensemble, la production et purification des TAS1R-DNT en CI en bactérie *E. coli* est satisfaisante. Les DNT-repliés sont fonctionnels et adaptés aux essais de liaisons par fluorescence intrinsèque avec les ligands. Cependant, bien que les quantités obtenues, de l'ordre de 1,5 mg pour 25 mg de CI pour hTAS1R1-DNT (rendement 7%) et 1,4 mg pour 15 mg de CI de hTAS1R3-DNT (rendement 9%) soient importantes, la proportion de récepteurs repliés biologiquement actifs reste limitante pour permettre de réaliser des études d'interaction par microcalorimétrie.

La deuxième approche a consisté à produire le DNT de TAS1R2 sous forme soluble en fusionnant la protéine avec l'étiquette SUMO, connue pour faciliter la solubilisation de certaines protéines difficiles à exprimer, tout en conservant les étiquettes His-Tag pour réaliser la purification du récepteur (Butt *et al.* 2005). De plus, l'induction a été réalisée sur 20 heures en diminuant la température de croissance à 20°C et la quantité d'IPTG à 0,1 mM pour favoriser les formes solubles. Malgré cela, les CI de SUMO-hTAS1R2-DNT restent majoritaires mais une faible quantité apparait sous forme soluble après une simple lyse des bactéries. L'isolation de la protéine par chromatographie IMAC suivi d'une chromatographie d'exclusion stérique a permis l'obtention d'une protéine correctement repliée et fonctionnelle. La présence d'une faible quantité de détergent (0,1 mM DDM) juste en dessous de la CMC, est toutefois nécessaire pour maintenir la solubilité de la protéine même en présence de la protéine de fusion SUMO. Les intéractions avec le sucralose, l'acesulfame K, le néotame et le sucrose ont été mesurées par fluorescence intrinsèque des tryptophanes. Ces résultats encourageants ont fait l'objet d'un poster présenté récemment à l'Achems en avril 2019. Dans le même temps, l'utilisation de la protéine SUMO pour produire hTAS1R2-DNT a récemment été publié par Assadi-Porter et collaborateurs (Assadi-Porter *et al.* 2018). Leurs résultats ont été obtenus après production de la protéine de fusion sous forme de corps d'inclusion et repliement en présence de détergent Zw3-14. Les mesures d'interaction ont été réalisées par dichroïsme circulaire, fluorescence intrinsèque des tryptophanes et RMN principalement sur le néotame et le sucralose.

II.2. Perspectives

Bien que la stratégie de production des TAS1R-DNT par repliement des CI ait été améliorée, d'autres options pourraient être étudier pour augmenter le taux de récepteur fonctionnel. Par exemple, pour les sous-unités du récepteur du goût umami, l'utilisation d'une résine L-Glutamic Acid Separopore® (Agarose) AB-CL pourrait permettre de concentrer uniquement la protéine active. Cependant, la faible affinité du TAS1R-DNT pour le L-Glu et l'utilisation du L-Glu lors du procédé d'élution risque de compliquer les mesures ultérieures d'interaction.

En ce qui concerne les détergents, de nouvelles molécules sont régulièrement synthétisées pour mimer l'environnement hydrophobe de la membrane plasmique. Comme il n'existe pas de règle sur le meilleur choix pour étudier un RCPG, la détermination empirique reste la plus utilisée. Il pourrait donc être intéressant de cribler à nouveau certains d'entre eux notamment ceux qui ont récemment montré de bons résultats pour d'autres RCPG de classe C. De la même, façon un certain nombre d'additifs pourraient être évalués (minéraux, glycérol, etc…). Afin de tester rapidement l'effet stabilisateur d'un grand nombre d'additifs j'ai mis en

place dans le laboratoire le Thermal Shift Assay (TSA). Cette méthode permet de quantifier les changements structuraux liés à la dénaturation thermique d'une protéine, donc sa stabilité, dans diverses conditions. Ce test permet en quelques heures de cribler de multiples conditions de tampon, en travaillant en microplaque 96 puits. Cette technique nécessite peu de protéines et utilise la rampe thermique d'un appareil à qPCR. Les résultats ont été particulièrement encourageants pour les protéines solubles synthétisées au laboratoire mais pas pour les RCPG. La présence du détergent est sans doute à l'origine de la perturbation de fluorescence de la sonde utilisée dans le TSA qui augmente le bruit de fond rendant le signal difficilement mesurable. Pour pallier, aux problèmes liés au détergent, l'utilisation des amphipols en substitut permettrait d'assurer une solubilité en solution aqueuse en absence de détergent. Des premiers essais réalisés sur le récepteur cTAS1R1-DNT m'ont permis de vérifier que l'amphipol A8-35 se fixait bien sur la sous-unité ;. La possibilité de travailler sans détergents reste un point crucial à solutionner pour pouvoir aborder d'autres méthodes de mesure d'interaction.

Enfin au cours de cette étude nous avons réalisé par mutagénèse dirigée et produit sous forme de CI de nombreux mutants du site orthostérique de TAS1R1-DNT. Les mutants T149A, D218A, R277A, E301A de TAS1R1-DNT devaient être utilisés pour valider la fixation du L-Glu et de l'IMP. De même, les mutants A110V et A372T devaient permettre d'évaluer l'impact du polymorphisme du gène *TAS1R1* sur l'interaction avec le L-Glu. La fonctionnalité de ces mutants reste à être testée. De plus, nos résultats obtenus lors de l'étude de TAS1R3-DNT nous incite à réaliser d'autres mutants pour cette sous-unité afin d'approfondir les mécanismes d'action et les résidus impliqués dans ces interactions avec le L-Glu et l'IMP. Ces travaux pourront être réalisés par repliement et pourront aussi être combinés à des tests cellulaires de mesure d'activité fonctionnelle par imagerie calcique.

III. Production de la sous-unité TAS1R2 en HEK293

III.1. Travaux accomplis

Mes travaux réalisés sur le récepteur olfactif hOR1A1 avant ma thèse m'ont permis d'apporter au laboratoire un nouveau modèle de production de protéine recombinante utilisant les cellules humaines HEK293S. Encouragés par cette expérience, nous avons voulu l'appliquer au récepteur du goût sucré. L'expression des TAS1R2 et TAS1R3 n'a pas encore été rapportée dans les systèmes d'expression de cellules de mammifères. Ce modèle cellulaire offre l'avantage de produire les modifications post-traductionnelles qui ne sont pas reproduites par les hôtes procaryotes, comme par exemple les glycosylations (Khan 2013).

Pour cela, en amont de ma thèse, j'ai préparé 3 lignées clonales de cellules HEK293S-GnTI$^-$ exprimant : soit la sous-unité TAS1R2, soit la sous-unité TAS1R3, soit les deux sous-unités TAS1R2 et TAS1R3. Un an aura été nécessaire pour réaliser cette première étape. Chacune de ces lignées a été amplifiée et induite pour synthétiser la(les) protéine(s) recombinante(s). Les culots cellulaires récoltés ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour purification. Du fait, qu'il faut environ 3 semaines de culture pour produire 20 à 40 culots cellulaires à partir de boîte T225 cm^2, les rendements et les coûts représentent un frein majeur aux expérimentations.

Afin de pouvoir purifier chacune des sous-unités de façon indépendante, les constructions des vecteurs codant chacun des gènes *TAS1R2* et *TAS1R3* ont été réalisées en ajoutant des séquences codant une étiquette FLAG en position N-terminale sur la construction codant TAS1R2, et deux étiquettes sur celle codant TAS1R3 : HA-tag en N-terminale et His$_{10}$-tag en position C-terminale. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la lignée clonale exprimant le récepteur entier avec ces deux sous-unités. Malgré un niveau d'induction assez élevé de l'expression des deux sous-unités, les analyses par immunomarquage ont montré que la localisation cellulaire des récepteurs était majoritairement cytoplasmique et que la localisation de chaque sous-unité, seule ou combinée, était très faible dans la membrane. La stratégie de purification développée a consisté à combiner différentes étapes d'immunoprécipitation, chromatographie IMAC et exclusion stérique pour purifier chacune des sous-unités et la fraction dimérique du récepteur. Les analyses par dichroïsme circulaire ont montré que les protéines étaient correctement repliées. Les analyses de l'état d'oligomérisation des fractions purifiées de hTAS1T2 et hTAS1R2/hTAS1R3 ont démontré que le récepteur était présent respectivement sous forme monomérique et dimérique comme attendu bien que les échantillons purifiés ne soient pas totalement homogènes. Les quantités collectées se sont révélées cependant extrêmement faibles et seule la fraction purifiée de hTAS1R2 a montré une activité fonctionnelle vis-à-vis du sucralose.

Dans un second temps, notre stratégie a consisté à travailler prioritairement sur la lignée exprimant seulement hTAS1R2. Les analyses par immunomarquage ont révélé que l'expression de la protéine était faiblement induite et que le récepteur était très faiblement adressée à la membrane confirmant les observations faites récemment par les travaux de Park et collaborateurs (Park *et al.* 2019) basés sur la sélection de mutants de TAS1R2 pour améliorer l'expression de surface et le co-trafic avec TAS1R3. Nous avons testé différents détergents jusqu'à l'étape finale de purification par gel filtration pour déterminer le plus adéquat en termes de solubilisation et de fonctionnalité. Le FC14 initialement retenu a été remplacé par le LMNG qui a permis d'obtenir un pic visible en chromatographie et des quantités plus importantes de récepteur purifié et fonctionnel. Nous avons ainsi démontré que hTAS1R2 était majoritairement présent sous-forme dimérique. Les mesures d'affinité réalisées par

fluorescence intrinsèque du trytophane ont montré que hTAS1R2 était capable de lier le sucralose, le néotame, l'acésulfame K et la périllartine avec des valeurs de K_d de l'ordre du micromolaire. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs d'EC_{50} mesurées par imagerie calcique en test cellulaire et les pouvoirs sucrants de ces édulcorants déterminés en analyse sensoriels. Ce nouveau modèle cellulaire offre donc l'opportunité de mesurer l'affinité de nouveaux ligands à l'échelle moléculaire. Il permet aussi de déterminer par différence avec les mesures réalisées sur le domaine N-terminal hTAS1R2-DNT, le site de fixation potentiel de ces ligands sur la sous-unité (DNT ou TMD).

III.2. Perspectives

Pour le moment les conditions de purification de la sous-unité hTAS1R3 n'ont pas été approfondies. Pour cela, il est possible de l'extraire soit de la lignée exprimant le récepteur du goût sucré entier, soit et sans doute de façon plus simple, en utilisant la lignée exprimant seulement hTAS1R3. On peut espérer que la présence des deux étiquettes HA-tag en position N-terminale et His_{10}-tag en position C-terminale facilite cette étape. La combinaison d'une chromatographie IMAC et l'utilisation de bille d'agarose greffée par un anticorps anti-HA devraient permettre d'obtenir une fraction purifiée. On peut espérer que le détergent LMNG offre les mêmes avantages en termes de solubilisation et de fonctionnalité que ceux obtenus pour hTAS1R2.

Ainsi, l'obtention individuelle des deux sous-unités pourrait peut-être permettre de mesurer l'interaction protéine-protéine entre hTAS1R2 et hTAS1R3. La méthode initialement envisagée pour cela était le BLI (Bio-Layer Interferometry) développé par la société FortéBio (Octet, par ailleurs disponible à l'Université de Dijon). En effet, la mesure des interactions par fluorescence intrinsèque des tryptophanes, bien que très sensible n'est pas adaptée aux interactions protéine-protéine du fait dans ce cas de la présence de tryptophane sur le récepteur et le ligand. La technique d'analyse des interactions moléculaires par BLI est une méthode optique basée sur l'analyse de l'interférence de la lumière réfléchie par deux surfaces. Sa mise en œuvre nécessite l'immobilisation d'une couche de protéine sur la pointe d'un biocapteur semblable à une micro fibre optique fonctionnalisée par des anticorps. La liaison entre la protéine fixée et un ligand ou une autre protéine en solution provoque une augmentation de l'épaisseur de la couche biologique à la pointe du biocapteur ce qui entraîne un décalage de longueur d'onde de la lumière réfléchie. Les interactions sont mesurées en temps réel, ce qui permet d'accéder aux constantes d'association et de dissociation. Ainsi, des mesures d'interactions récepteur sucré et protéine sucrée (brazzéine, monelline ou thaumatine) pourraient être réalisées.

IV. Etude du récepteur à l'amer TAS2R14

IV.1. Travaux accomplis

Au cours de mon travail de thèse et en parallèle avec d'autres projets, j'ai développé au sein de notre équipe un nouvel outil permettant de mesurer en temps réel l'activité des récepteurs gustatifs par la technique d'imagerie calcique. Mes précédents travaux sur les récepteurs olfactifs m'ont amené dès 2005 à développer cette méthode en utilisant à l'époque un microscope à fluorescence équipé d'une caméra couplée à un logiciel d'analyse d'image. L'équipement permettait au mieux de réaliser une quarantaine d'injections manuelles au puits par puits (2 minutes d'acquisition par puits) en une demi-journée passée dans le noir, suivi d'au moins une à deux journées de traitement d'analyses d'images des séquences enregistrées pour mesurer la réponse de chaque cellule individuellement. Notre laboratoire a acquis fin 2015 un nouvel équipement appelé FlexStation 3 (Molecular Devices) afin de réaliser cette technique de façon automatisée. En effet, la FlexStation 3 est un lecteur de microplaque multimodale équipé d'une tête d'injection à 8 canaux qui permet de mesurer les variations de flux calciques intracellulaires sur cellules vivantes par une sonde fluorescente et d'injecter en même temps les ligands à tester. Ainsi une plaque 96 puits peut recevoir des gammes d'injections de 12 ligands, testés à 8 concentrations différentes en seulement 25 minutes.

Pour étudier l'activité fonctionnelle des récepteurs gustatifs, j'ai créé dans un premier temps une lignée cellulaire de HEK293T exprimant de façon stable un protéine G chimère de la gustducine. Pour cela j'ai utilisé initialement deux constructions plasmidiques, l'une codant pour la protéine Gα16 et les 44 acides aminés situés en position C-terminale de la gustducine et l'autre codant pour la protéine Gα16 et le 5 derniers acides aminés de la protéine Gαi3. Chaque plasmide a été transfecté de façon stable dans les cellules HEK293T et pour chacune de constructions, environ 50 clones ont été sélectionnés, repiqués, amplifiés et évalués pour leur activité fonctionnelle par imagerie calcique en présence de sucralose après transfection transitoire avec les plasmides codant les sous-unités TAS1R2 et TAS1R3. Le clone exprimant la meilleure activité fonctionnelle a été sélectionné et amplifié pour la suite des études sur les récepteurs du goût. Les premières données ont consisté à optimiser d'une part les conditions de culture, d'ensemencement, de transfection, et d'autres part les conditions d'injection, de lecture et d'analyses des données.

En mars 2017, j'ai été accueillie pendant trois semaines par l'équipe du Professeur Wolfgang Meyerhof à Potsdam (Department of Molecular Genetics, German Institute of Human Nutrition). J'ai suivi et réalisé sur place les tests calciques sur les récepteurs au goût sucré, umami, amer et j'ai pu comparer nos constructions plasmidiques TAS1R2/TAS1R3 à leur référence interne. A mon retour au laboratoire, ce travail m'a permis d'améliorer nos

méthodes. Nous avons aussi pu bénéficier, après un accord de transfert de matériel, de l'utilisation des 25 constructions des récepteurs à l'amer utilisées par leur laboratoire pour initier nos propres travaux. J'ai ainsi pu valider en interne la réponse fonctionnelle des 25 récepteurs à l'amer vis-à-vis de nombreux ligands. Il nous est apparu qu'à terme et dans un souci d'indépendance pour nos projets, nous devrions réaliser nos propres constructions plasmidiques. C'est de là qu'est née la stratégie de l'étude réalisée sur le récepteur TAS2R14. L'objectif de ce travail a été de mettre au point une construction permettant une expression fonctionnelle du récepteur au moins équivalente avec un adressage membranaire efficace du récepteur et la possibilité de visualiser celui-ci par immunocytochimie. Pour cela nous avons testé différents peptides d'adressage décrits dans la bibliographie, différentes positions de l'étiquette Flag-tag et la présence d'une séquence (QBI SP163) en amont du codon d'initiation pour favoriser la transcription et traduction du gène. Nos résultats nous ont permis de proposer un modèle de vecteur pour l'expression des récepteurs à l'amer. Le résultat le plus significatif a été l'insertion de la séquence d'amplification de la traduction qui permet d'augmenter le signal mesuré à la fois en termes d'amplitude de la réponse calcique et d'affinité pour le ligand (diminution de la valeur de l'EC_{50} par un décalage vers la gauche des courbes dose-réponse). Rapidement, nous avons évalué l'impact de cette modification sur l'expression de nos constructions plasmidiques codant pour le récepteur au goût sucré. Des résultats plus robustes en termes d'amplitude du signal ont été mesurés pour des ligands sucrés de référence et ont permis de déterminer des valeurs d'EC_{50} plus faibles ou équivalentes confirmant les résultats obtenus précédemment avec TAS2R14. Les expériences permettant de mesurer l'effet de synergie de l'IMP avec le récepteur au goût sucré ont été répétées pour confirmation avec ces nouvelles constructions TAS1R2 et TAS1R3. Pour la suite, il été décidé d'intégrer désormais la séquence d'amplification de la traduction QBI SP163 dans toutes nos futures constructions.

IV.2. Perspectives

Les résultats de notre étude préliminaire sur TAS2R14 nous ont conduit à synthétiser les constructions codant les 25 TAS2R selon la même stratégie : pcDNA4-MAX-SST3-TAS2Rx-Flag. Les premiers tests consistant à valider chacune des constructions en présence de ligands de référence sont en cours.

De la même façon, de nouvelles constructions ont été synthétisées pour l'expression du récepteur au goût sucré dans d'autres espèces animales comme la souris, le chien, le porc, la vache et le cheval. L'étude de nouveaux modèles de récepteurs gustatifs animaux fournit une alternative utile pour comprendre à l'échelle moléculaire les déterminants biologiques de la consommation d'aliments riches en carbohydrates et expliquer le comportement et les

préférences alimentaires de ces espèces comparativement à l'Homme (da Silva *et al.* 2014, Daly *et al.* 2012, Randall *et al.* 1978, Reed 2008). Quelques travaux ont été publiés sur les préférences alimentaires de ces animaux mesurés par des tests sensoriels, mais peu de données sur les interactions moléculaires des récepteurs gustatifs avec les molécules sucrées sont disponibles à l'exception du modèle souris.

Concernant, le récepteur au goût umami, nous avons préparé les constructions des gènes codant TAS1R1 et TAS1R3 pour étudier les interactions moléculaires de ligands connus ou à déterminer dans nos futurs projets. A ce stade, l'étude du récepteur umami reste un défi à relever. En effet, la détection de l'expression fonctionnelle en cellules HEK293 semble plus délicate. Il n'est pas toujours clairement établi dans la bibliographie si les données obtenues par certaines équipes ont été réalisées par imagerie sous microscope ou à l'aide d'un lecteur de plaque automatisé (FlexStation ou FLIPR). Pour valider notre système d'expression et de détection, nos premiers essais auront pour but de confirmer l'effet synergique de l'IMP sur le L-Glu déjà démontré par Li et collaborateurs (Li *et al.* 2002) en microscopie classique ou par Xu et collaborateurs (Xu *et al.* 2004) et Toda et collaborateurs (Toda *et al.* 2013) en FLIPR. Pour cette dernière équipe, il s'avère que les données publiées sur le récepteur umami sont réalisées par luminescence en FLIPR. Leur système cellulaire intègre la transfection d'une chimère dérivée de la clytine, en plus de TAS1R1 et TAS1R3, l'utilisation de la coelenterazine comme sonde calcique bioluminescente, et une lecture par luminescence des flux calciques. La luminescence offre généralement une meilleure sensibilité de détection, un bruit de fond quasi absent, et la possibilité de tester des ligands qui ont l'inconvénient d'être fluorescents aux longueurs d'onde habituellement utilisées pour les sondes calciques fluorescentes. On peut penser que si le signal du récepteur umami est délicat à mesurer, l'utilisation de ce système pourra devenir nécessaire, c'est pour cela que nous avons pu obtenir la construction clytine pour envisager cette option de lecture si besoin.

Pour compléter ces perspectives concernant les études fonctionnelles des récepteurs gustatifs, nous avons acquis récemment un FLIPR Tetra. Cet équipement installé en mars 2019 est équipé d'une tête d'injection 96 puits et d'une caméra à haute sensibilité pour les acquisitions en fluorescence et luminescence. J'ai pour mission d'adapter nos techniques d'injection et de lecture afin d'optimiser encore nos études sur les récepteurs gustatifs. Le FLIPR permet d'acquérir en quelques minutes les cinétiques calciques sur 96 puits en simultané tout en injectant les gammes de ligands à tester. Il réduit donc drastiquement le temps d'acquisition des données et permet de comparer sur une même plaque à un instant donné les réponses cellulaires. Il ouvre la voie à des études de criblage à plus haut débit ou à l'étude de nombreux mutants des récepteurs du goût.

V. Intérêt et limites des différentes approches d'études des récepteurs gustatifs, que choisir ?

Chaque modèle cellulaire possède ses avantages et inconvénients et ils apparaissent complémentaires. Le choix initial de la méthode dépend principalement de l'objectif fixé.

La production des CI obtenus en *E. coli* est une méthode peu coûteuse et rapide (3 jours) facilement accessible à de nombreux laboratoires équipés pour la microbiologie. Les CI récoltés après induction des bactéries et lavage peuvent être stockés à -80°C pendant plusieurs années et permettent de travailler pendant plusieurs semaines sans relancer de culture bactérienne en continu. Différents mutants du gène d'intérêt peuvent être réalisés par mutagénèse dirigée sur la construction plasmidique initiale. Ces nouveaux vecteurs peuvent être transformés en *E. coli* en 24 heures et rapidement exploités pour produire de nouveaux CI. La partie purification est réalisée en 2,5 jours. Après purification par gel filtration, la protéine est disponible dès le troisième jour pour commencer les mesures d'activités fonctionnelles. L'utilisation des CI permet d'accéder à des quantités importantes de récepteur purifié de l'ordre de plusieurs milligrammes. La phase délicate réside principalement dans le protocole de solubilisation et purification pour trouver les conditions adéquates de repliement de la protéine. Ces conditions sont souvent à déterminer de façon empirique car il n'existe pas de règles établies même par type de RCPG (classe A, classe C). Le détergent est un facteur clef important pour la solubilisation et la fonctionnalité de la protéine purifiée de même que certains additifs. L'obtention d'une protéine pure, en absence d'agrégats est généralement révélée par le chromatogramme homogène et symétrique de gel filtration. Les limites du système sont liées à l'utilisation des bactéries qui sont incapables de réaliser les modifications post-traductionnelles présentes chez les eucaryotes et qui sont parfois indispensables à la fonctionnalité de la protéine à étudier.

La production en cellules de mammifères est une méthode coûteuse et nécessite l'accès à un laboratoire de culture cellulaire classé L2 en termes de pathogénicité pour certaines lignées (cas de HEK293). Contrairement aux bactéries *E. coli* qui ont la faculté de doubler leur biomasse en 20 minutes en pleine phase de croissance, les cellules de mammifères ont un temps de doublement d'environ 24 H ce qui rend leur croissance beaucoup plus lente. La réalisation de lignée clonale exprimant un gène d'intérêt inductible nécessite de transfecter les cellules et de les soumettre à une sélection par antibiotique qui conduit à la mort de 95 % de la population cellulaire. Il faut attendre environ 2 à 3 semaines pour voir apparaître les premiers clones et au moins 2 mois de repiquage et d'expansion en puits, puis en boîte, pour obtenir des quantités de cellules transformées à la fois pour la cryoconservation et pour les premiers tests d'induction. De nombreux clones doivent être criblés pour leur capacité de production du récepteur et/ou leur activité fonctionnelle. On comprend dès lors qu'il est difficile de concevoir une étude sur différents mutants du gène d'intérêt. Pour obtenir

suffisamment de protéine purifiée, la lignée doit être amplifiée de façon continue et des lots de cellules régulièrement induits. La congélation à -80°C des culots cellulaires récoltés après induction offre cependant l'avantage de pouvoir les cumuler pour des analyses ultérieures. L'étape de purification est réalisée en 1 à 2 jours et les études de fonctionnalité réalisées dans la foulée. Les quantités de récepteur purifié sont faibles, de l'ordre du microgramme ce qui limite son utilisation à certaines méthodes biochimiques. Les cellules eucaryotes humaines ont l'avantage de réaliser les modifications post-traductionnelles des protéines. On utilise cependant une lignée déficiente en N-acetyl-glucosamininyltransferase afin de limiter ces glycosylations qui pourrait rendre délicate la purification d'une protéine sous forme homogène. Cette déficience est à la fois utile mais peut poser problème pour certaines protéines et pourrait peut-être expliquer aussi la faible expression de notre récepteur TAS1R2.

D'un point de vue stabilité, il est connu que les RCPG purifiés perdent leur activité en quelques jours. Au sein du laboratoire, la protéine purifiée à partir d'*E*. *coli* ou de HEK293 est utilisée dans les 3 jours maximum après sa production. Ce facteur complique la réalisation de certaines expérimentations. Pour remédier à ce défaut, de nombreux travaux pour augmenter la stabilité des RCPG purifiés sont menés par différentes équipes et l'utilisation des amphipols a permis d'allonger ces délais à plus de 10 jours pour certains d'entre eux.

L'utilisation des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec les gènes d'intérêt pour des études basées sur l'activité fonctionnelle sur cellules vivantes offre de nombreux avantages. Tout d'abord la méthode offre la souplesse de pouvoir évaluer les interactions moléculaires de différents récepteurs, ou mutants des récepteurs, avec de nombreux ligands en même temps. Ainsi, il est possible d'étudier la réponse fonctionnelle des 25 récepteurs du goût amer simultanément, éventuellement sur une même plaque de culture. Le protocole, réalisé sur 3 jours, est relativement rapide. L'ensemencement est suivi après 24 heures par l'étape de transfection, elle-même poursuivit après 24 heures par la mesure de l'activité fonctionnelle.

L'apport indéniable réside dans la quantité de données générées qui peut atteindre du haut débit lorsqu'on utilise le FLIPR. L'utilisation de lignée cellulaire humaine permet d'extrapoler les données à l'Homme. Comme pour l'industrie pharmaceutique qui teste de nombreuses molécules chimiques à vocation de médicaments pour des RCPG cibles impliqués dans différentes maladies, les tests calciques sur les récepteurs du goût peuvent être une première étape pour cribler de nouvelles molécules sapides seules ou en mélange sans soucis d'innocuité.

Outre le coût complet extrêmement élevé des tests cellulaires (produits, consommables, kits de détection, maintenance des équipements), on notera quelques inconvénients à la technique qui peuvent impacter les résultats. Malgré la standardisation des

procédures, le fait de travailler sur du matériel vivant, combiné à la réalisation des essais par différents manipulateurs, peut entraîner des variations intra et inter laboratoires des résultats. C'est pourquoi à minima il convient de répéter au moins trois fois les tests sur au moins trois plaques de culture, réalisées sur au moins trois jours différents. Certains composés sont capables d'activer la voie calcique par d'autres récepteurs endogènes, il faut donc systématiquement associer à chaque ligand testé, un contrôle réalisé sur des cellules qui ne sont pas transfectées par le gène d'intérêt, mais seulement par le plasmide ayant été utilisé pour la construction.

Les produits de transfection permettant de faire pénétrer le gène dans la cellule ne sont pas anodins. Ils forment généralement des sortes de liposomes qui enrobe le vecteur et vont fusionner avec la membrane plasmique ce qui entraîne parfois une augmentation de la sensibilité des cellules en fonction du temps de contact avec le produit de transfection. A ce titre, il existe sur le marché une grande variété de composés qu'il peut être intéressant de tester régulièrement. De même les plasmides purifiés peuvent contenir des endotoxines bactériennes résiduelles qui sont toxiques pour les cellules. Ces endotoxines sont par exemple des liposaccharides thermostables. Il existe de nombreux kits de purification de plasmides, dits « endotoxin-free » pour éliminer ces toxines qu'il peut être intéressant d'évaluer et de comparer en vérifiant la sensibilité des cellules après transfection.

Enfin, les tests cellulaires sont basés sur la mesure d'une voie de signalisation qui arrive en aval de l'interaction moléculaire ligand-récepteur. On ne mesure donc pas la liaison du ligand au récepteur mais sa capacité à l'activer. On obtient donc une valeur d'EC_{50} qui représente la concentration d'un ligand qui induit 50% de l'effet maximum mesuré. De ce fait, on ne peut pas déterminer d'EC_{50} pour certains ligands qui se fixent au récepteur sans l'activer, comme certains modulateurs allostériques ou inhibiteurs. C'est le cas par exemple de l'IMP qui se lie au récepteur du goût umami mais n'entraîne pas de réponse calcique quand il est utilisé seul. L'absence de réponse ne veut pas dire absence de liaison au récepteur et de faux négatifs peuvent être fréquents.

En conclusion, une grande variété d'approches est disponible pour l'étude des récepteurs gustatifs. Leur classification en RCPG les rend difficiles à étudier mais bénéficie à l'inverse des progrès technologiques phénoménaux liés à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques sur d'autres RCPG d'intérêt pharmaceutiques. Il est fort à parier que ces avancées profiteront aux récepteurs gustatifs, d'autant que les découvertes récentes de leur présence dans les systèmes extra-oraux ouvrent des perspectives pour la découverte de molécules inhibitrices ou de modulateurs allostériques.

Références bibliographiques

Aburto, N. J., Ziolkovska, A., Hooper, L., Elliott, P., Cappuccio, F. P. and Meerpohl, J. J. (2013) Effect of lower sodium intake on health: systematic review and meta-analyses. *Bmj, 346*, pp. f1326.
Acevedo, W., Gonzalez-Nilo, F. and Agosin, E. (2016) Docking and Molecular Dynamics of Steviol Glycoside-Human Bitter Receptor Interactions. *J Agric Food Chem, 64*(40), pp. 7585-7596.
Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell, 100*(6), pp. 693-702.
Ahmed, S. H., Guillem, K. and Vandaele, Y. (2013) Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 16*(4), pp. 434-9.
Allen, A. L., McGeary, J. E., Knopik, V. S. and Hayes, J. E. (2013) Bitterness of the non-nutritive sweetener acesulfame potassium varies with polymorphisms in TAS2R9 and TAS2R31. *Chem Senses, 38*(5), pp. 379-89.
Amino, Y., Nakazawa, M., Kaneko, M., Miyaki, T., Miyamura, N., Maruyama, Y. and Eto, Y. (2016) Structure-CaSR-Activity Relation of Kokumi gamma-Glutamyl Peptides. *Chem Pharm Bull (Tokyo), 64*(8), pp. 1181-9.
Ammon, C., Schafer, J., Kreuzer, O. J. and Meyerhof, W. (2002) Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem, 110*(1-2), pp. 137-45.
An, W. F. and Tolliday, N. (2010) Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol Biotechnol, 45*(2), pp. 180-6.
Andrell, J. and Tate, C. G. (2013) Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Mol Membr Biol, 30*(1), pp. 52-63.
Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Pinacho, R., Haro, J. M., Ramos, B. and Ferrer, I. (2015) Decrease in olfactory and taste receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia. *J Psychiatr Res, 60*, pp. 109-16.
Assadi-Porter, F. M., Patry, S. and Markley, J. L. (2008) Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in E. coli. *Protein Expr Purif, 58*(2), pp. 263-8.
Assadi-Porter, F. M., Radek, J., Rao, H. and Tonelli, M. (2018) Multimodal Ligand Binding Studies of Human and Mouse G-Coupled Taste Receptors to Correlate Their Species-Specific Sweetness Tasting Properties. *Molecules, 23*(10).
Assadi-Porter, F. M., Tonelli, M., Maillet, E. L., Markley, J. L. and Max, M. (2010) Interactions between the human sweet-sensing T1R2-T1R3 receptor and sweeteners detected by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta, 1798*(2), pp. 82-6.
Bachmanov, A. A. and Beauchamp, G. K. (2007) Taste receptor genes. *Annu Rev Nutr, 27*, pp. 389-414.
Backes, M., Obst, K., Bojahr, J., Thorhauer, A., Roudnitzky, N., Paetz, S., Reichelt, K. V., Krammer, G. E., Meyerhof, W. and Ley, J. P. (2015) Rubemamine and Rubescenamine, Two Naturally Occurring N-Cinnamoyl Phenethylamines with Umami-Taste-Modulating Properties. *J Agric Food Chem, 63*(39), pp. 8694-704.
Backes, M., Paetz, S., Vossing, T. and Ley, J. P. (2014) Synthesis and sensory studies of umami-active scaffolds. *Chem Biodivers, 11*(11), pp. 1782-97.
Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De Jesus, M. and Wurm, F. M. (2008) Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res, 36*(15), pp. e96.
Bae, H. E. and Du, Y. (2019) Asymmetric maltose neopentyl glycol amphiphiles for a membrane protein study: effect of detergent asymmetricity on protein stability. *10*(4), pp. 1107-1116.
Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. and Wurm, F. M. (2007) Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett, 29*(5), pp. 677-84.
Baneres, J. L., Popot, J. L. and Mouillac, B. (2011) New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol, 29*(7), pp. 314-22.
Bartel, D. L., Sullivan, S. L., Lavoie, E. G., Sevigny, J. and Finger, T. E. (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol, 497*(1), pp. 1-12.
Bawa, Z., Bland, C. E., Bonander, N., Bora, N., Cartwright, S. P., Clare, M., Conner, M. T., Darby, R. A., Dilworth, M. V., Holmes, W. J., Jamshad, M., Routledge, S. J., Gross, S. R. and Bill, R. M. (2011) Understanding the yeast host cell response to recombinant membrane protein production. *Biochem Soc Trans, 39*(3), pp. 719-23.
Bdioui, S., Verdi, J., Pierre, N., Trinquet, E., Roux, T. and Kenakin, T. (2018) Equilibrium Assays Are Required to Accurately Characterize the Activity Profiles of Drugs Modulating Gq-Protein-Coupled Receptors. *Mol Pharmacol, 94*(3), pp. 992-1006.
Behrens, M., Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C. and Meyerhof, W. (2006) Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem, 281*(29), pp. 20650-9.
Behrens, M., Blank, K. and Meyerhof, W. (2017) Blends of Non-caloric Sweeteners Saccharin and Cyclamate Show Reduced Off-Taste due to TAS2R Bitter Receptor Inhibition. *Cell Chem Biol, 24*(10), pp. 1199-1204.e2.
Behrens, M., Briand, L., de March, C. A., Matsunami, H., Yamashita, A., Meyerhof, W. and Weyand, S. (2018) Structure-Function Relationships of Olfactory and Taste Receptors. *Chem Senses, 43*(2), pp. 81-87.
Behrens, M., Foerster, S., Staehler, F., Raguse, J. D. and Meyerhof, W. (2007) Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *J Neurosci, 27*(46), pp. 12630-40.
Behrens, M. and Meyerhof, W. (2009) Mammalian bitter taste perception. *Results Probl Cell Differ, 47*, pp. 203-20.
Behrens, M. and Meyerhof, W. (2018) Vertebrate Bitter Taste Receptors: Keys for Survival in Changing Environments. *J Agric Food Chem, 66*(10), pp. 2204-2213.
Behrens, M., Meyerhof, W., Hellfritsch, C. and Hofmann, T. (2011) Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl, 50*(10), pp. 2220-42.
Belitz, H. D. and Wieser, H. (1985) Bitter compounds: Occurrence and structure-activity relationships. *Food Reviews International, 1*(2), pp. 271-354.

Belloir, C., Miller-Leseigneur, M. L., Neiers, F., Briand, L. and Le Bon, A. M. (2017a) Biophysical and functional characterization of the human olfactory receptor OR1A1 expressed in a mammalian inducible cell line. *Protein Expr Purif, 129*, pp. 31-43.
Belloir, C., Savistchenko, J., Neiers, F., Taylor, A. J., McGrane, S. and Briand, L. (2017b) Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli. *PLoS One, 12*(10), pp. e0187051.
Besnard, P., Passilly-Degrace, P. and Khan, N. A. (2016) Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiol Rev, 96*(1), pp. 151-76.
Beyreuther, K., Biesalski, H. K., Fernstrom, J. D., Grimm, P., Hammes, W. P., Heinemann, U., Kempski, O., Stehle, P., Steinhart, H. and Walker, R. (2007) Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. *Eur J Clin Nutr, 61*(3), pp. 304-13.
Bezencon, C., le Coutre, J. and Damak, S. (2007) Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses, 32*(1), pp. 41-9.
Biarnes, X., Marchiori, A., Giorgetti, A., Lanzara, C., Gasparini, P., Carloni, P., Born, S., Brockhoff, A., Behrens, M. and Meyerhof, W. (2010) Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One, 5*(8), pp. e12394.
Bigiani, A. (2001) Mouse taste cells with glialike membrane properties. *J Neurophysiol, 85*(4), pp. 1552-60.
Bill, R. M. (2014) Playing catch-up with Escherichia coli: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Front Microbiol, 5*, pp. 85.
Bird, L. E. (2011) High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in Escherichia coli. *Methods, 55*(1), pp. 29-37.
Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A. and Burnstock, G. (1999) Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport, 10*(5), pp. 1107-11.
Bollin, F., Dechavanne, V. and Chevalet, L. (2011) Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expr Purif, 78*(1), pp. 61-8.
Bonander, N. and Bill, R. M. (2012) Optimising yeast as a host for recombinant protein production (review). *Methods Mol Biol, 866*, pp. 1-9.
Born, S., Levit, A., Niv, M. Y., Meyerhof, W. and Behrens, M. (2013) The human bitter taste receptor TAS2R10 is tailored to accommodate numerous diverse ligands. *J Neurosci, 33*(1), pp. 201-13.
Brauner-Osborne, H., Wellendorph, P. and Jensen, A. A. (2007) Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Curr Drug Targets, 8*(1), pp. 169-84.
Breslin, P. A. and Huang, L. (2006) Human taste: peripheral anatomy, taste transduction, and coding. *Adv Otorhinolaryngol, 63*, pp. 152-90.
Briand, L. and Salles, C. (2016) Taste perception and integration. in *Flavor: From Food to Behaviors, Wellbeing and Health*: Elsevier Ltd. pp. 460 p.
Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G. and Meyerhof, W. (2007) Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J Agric Food Chem, 55*(15), pp. 6236-43.
Brockhoff, A., Behrens, M., Niv, M. Y. and Meyerhof, W. (2010) Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(24), pp. 11110-5.
Brockhoff, A., Behrens, M., Roudnitzky, N., Appendino, G., Avonto, C. and Meyerhof, W. (2011) Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci, 31*(41), pp. 14775-82.
Buckholz, L. and Scharpf, L. (1994) Aconitic acid, gluconic acid and/or succinic acid taken alone or further together with sclareolide in enhancing the organoleptic properties of foodstuffs in.
Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Tharp, C. D., Slack, J. P., Kim, U. K., Drayna, D. and Meyerhof, W. (2005) The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol, 15*(4), pp. 322-7.
Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J. D. and Meyerhof, W. (2002) The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet, 32*(3), pp. 397-401.
Burrin, D. G. and Stoll, B. (2009) Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr, 90*(3), pp. 850s-856s.
Bushdid, C., de March, C. A., Topin, J., Do, M., Matsunami, H. and Golebiowski, J. (2019) Mammalian class I odorant receptors exhibit a conserved vestibular-binding pocket. *76*(5), pp. 995-1004.
Bushman, J. D., Ye, W. and Liman, E. R. (2015) A proton current associated with sour taste: distribution and functional properties. *Faseb j, 29*(7), pp. 3014-26.
Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. and Mattern, M. R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif, 43*(1), pp. 1-9.
Cai, C., Li, L., Lu, N., Zheng, W., Yang, L. and Liu, B. (2016) Expression of a high sweetness and heat-resistant mutant of sweet-tasting protein, monellin, in Pichia pastoris with a constitutive GAPDH promoter and modified N-terminus. *Biotechnol Lett, 38*(11), pp. 1941-1946.
Caicedo, A. and Roper, S. D. (2001) Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science, 291*(5508), pp. 1557-60.
Calvo, S. S. and Egan, J. M. (2015) The endocrinology of taste receptors. *Nat Rev Endocrinol, 11*(4), pp. 213-27.
Canon, F., Neiers, F. and Guichard, E. (2018) Saliva and Flavor Perception: Perspectives. *J Agric Food Chem, 66*(30), pp. 7873-7879.
Carleton, A., Accolla, R. and Simon, S. A. (2010) Coding in the mammalian gustatory system. *Trends Neurosci, 33*(7), pp. 326-34.
Cartoni, C., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Shigemura, N., Yoshida, R., Godinot, N., le Coutre, J., Ninomiya, Y. and Damak, S. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci, 30*(25), pp. 8376-82.
Cartwright, S. P., Mikaliunaite, L. and Bill, R. M. (2016) Membrane Protein Production in the Yeast, S. cerevisiae. *Methods Mol Biol, 1432*, pp. 23-35.

Castillo, D., Seidel, K., Salcedo, E., Ahn, C., de Sauvage, F. J., Klein, O. D. and Barlow, L. A. (2014) Induction of ectopic taste buds by SHH reveals the competency and plasticity of adult lingual epithelium. *Development, 141*(15), pp. 2993-3002.
Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature, 389*(6653), pp. 816-24.
Chale-Rush, A., Burgess, J. R. and Mattes, R. D. (2007) Multiple routes of chemosensitivity to free fatty acids in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292*(5), pp. G1206-12.
Chambers, C., Smith, F., Williams, C., Marcos, S., Liu, Z. H., Hayter, P., Ciaramella, G., Keighley, W., Gribbon, P. and Sewing, A. (2003) Measuring intracellular calcium fluxes in high throughput mode. *Comb Chem High Throughput Screen, 6*(4), pp. 355-62.
Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature, 444*(7117), pp. 288-94.
Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature, 464*(7286), pp. 297-301.
Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S. and Ryba, N. J. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell, 100*(6), pp. 703-11.
Chang, R. B., Waters, H. and Liman, E. R. (2010) A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(51), pp. 22320-5.
Chattopadhyay, A., Rao, B. D. and Jafurulla, M. (2015) Solubilization of G protein-coupled receptors: a convenient strategy to explore lipid-receptor interaction. *Methods Enzymol, 557*, pp. 117-34.
Chaudhari, N., Pereira, E. and Roper, S. D. (2009) Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *Am J Clin Nutr, 90*(3), pp. 738s-742s.
Chaudhari, N. and Roper, S. D. (2010) The cell biology of taste. *The Journal of Cell Biology, 190*(3), pp. 285-296.
Chaudhary, S., Pak, J. E., Pedersen, B. P., Bang, L. J., Zhang, L. B., Ngaw, S. M., Green, R. G., Sharma, V. and Stroud, R. M. (2011) Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected Human Embryonic Kidney 293S cells. *Methods, 55*(4), pp. 273-80.
Cheron, J. B., Golebiowski, J., Antonczak, S. and Fiorucci, S. (2017) The anatomy of mammalian sweet taste receptors. *85*(2), pp. 332-341.
Cho, M. J., Unklesbay, N., Hsieh, F. H. and Clarke, A. D. (2004) Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J Agric Food Chem, 52*(19), pp. 5895-901.
Clapp, T. R., Stone, L. M., Margolskee, R. F. and Kinnamon, S. C. (2001) Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci, 2*, pp. 6.
Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C. L., Kinnamon, S. C. and Kinnamon, J. C. (2004) Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J Comp Neurol, 468*(3), pp. 311-21.
Clark, A. A., Dotson, C. D., Elson, A. E., Voigt, A., Boehm, U., Meyerhof, W., Steinle, N. I. and Munger, S. D. (2015) TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *Faseb j, 29*(1), pp. 164-72.
Clemmensen, C., Smajilovic, S., Wellendorph, P. and Brauner-Osborne, H. (2014) The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: from cloning to physiological function. *Br J Pharmacol, 171*(5), pp. 1129-41.
Conn, P. J., Christopoulos, A. and Lindsley, C. W. (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov, 8*(1), pp. 41-54.
Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P. and Andres-Barquin, P. J. (2002) Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res, 98*(1), pp. 45-53.
Cook, B. L., Ernberg, K. E., Chung, H. and Zhang, S. (2008) Study of a Synthetic Human Olfactory Receptor 17-4: Expression and Purification from an Inducible Mammalian Cell Line. *PLoS One, 3*(8), pp. e2920.
Cook, B. L., Steuerwald, D., Kaiser, L., Graveland-Bikker, J., Vanberghem, M., Berke, A. P., Herlihy, K., Pick, H., Vogel, H. and Zhang, S. (2009) Large-scale production and study of a synthetic G protein-coupled receptor: Human olfactory receptor 17-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 106*(29), pp. 11925.
Cooray, S. N., Chan, L., Webb, T. R., Metherell, L. and Clark, A. J. (2009) Accessory proteins are vital for the functional expression of certain G protein-coupled receptors. *Mol Cell Endocrinol, 300*(1-2), pp. 17-24.
Coupland, J. N. and Hayes, J. E. (2014) Physical approaches to masking bitter taste: lessons from food and pharmaceuticals. *Pharm Res, 31*(11), pp. 2921-39.
da Silva, E. C., de Jager, N., Burgos-Paz, W., Reverter, A., Perez-Enciso, M. and Roura, E. (2014) Characterization of the porcine nutrient and taste receptor gene repertoire in domestic and wild populations across the globe. *BMC Genomics, 15*, pp. 1057.
Dahmane, T., Damian, M., Mary, S., Popot, J. L. and Baneres, J. L. (2009) Amphipol-assisted in vitro folding of G protein-coupled receptors. *Biochemistry, 48*(27), pp. 6516-21.
Dai, W., You, Z., Zhou, H., Zhang, J. and Hu, Y. (2011) Structure-function relationships of the human bitter taste receptor hTAS2R1: insights from molecular modeling studies. *J Recept Signal Transduct Res, 31*(3), pp. 229-40.
Dalton, A. C. and Barton, W. A. (2014) Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci, 23*(5), pp. 517-25.
Daly, K., Al-Rammahi, M., Arora, D. K., Moran, A. W., Proudman, C. J., Ninomiya, Y. and Shirazi-Beechey, S. P. (2012) Expression of sweet receptor components in equine small intestine: relevance to intestinal glucose transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 303*(2), pp. R199-208.
Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Zou, S., Jiang, P., Ninomiya, Y. and Margolskee, R. F. (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science, 301*(5634), pp. 850-3.
Dando, R. and Roper, S. D. (2009) Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. *J Physiol, 587*(Pt 24), pp. 5899-906.

Darby, R. A., Cartwright, S. P., Dilworth, M. V. and Bill, R. M. (2012) Which yeast species shall I choose? Saccharomyces cerevisiae versus Pichia pastoris (review). *Methods Mol Biol, 866*, pp. 11-23.
DeFazio, R. A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J. W., Pereira, E., Roper, S. D. and Chaudhari, N. (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci, 26*(15), pp. 3971-80.
Deloose, E., Biesiekierski, J. R., Vanheel, H., Depoortere, I. and Tack, J. (2018) Effect of motilin receptor activation on food intake and food timing. *Am J Clin Nutr, 107*(4), pp. 537-543.
Deloose, E., Janssen, P., Corsetti, M., Biesiekierski, J., Masuy, I., Rotondo, A., Van Oudenhove, L., Depoortere, I. and Tack, J. (2017) Intragastric infusion of denatonium benzoate attenuates interdigestive gastric motility and hunger scores in healthy female volunteers. *Am J Clin Nutr, 105*(3), pp. 580-588.
Di Pizio, A., Levit, A., Slutzki, M., Behrens, M., Karaman, R. and Niv, M. Y. (2016) Comparing Class A GPCRs to bitter taste receptors: Structural motifs, ligand interactions and agonist-to-antagonist ratios. *Methods Cell Biol, 132*, pp. 401-27.
Dias, A. G., Eny, K. M., Cockburn, M., Chiu, W., Nielsen, D. E., Duizer, L. and El-Sohemy, A. (2015) Variation in the TAS1R2 Gene, Sweet Taste Perception and Intake of Sugars. *J Nutrigenet Nutrigenomics, 8*(2), pp. 81-90.
Dong, D., Jones, G. and Zhang, S. (2009) Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology, 9*(1), pp. 12.
Dore, A. S., Okrasa, K., Patel, J. C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R. M., Errey, J. C., Jazayeri, A., Khan, S., Tehan, B., Weir, M., Wiggin, G. R. and Marshall, F. H. (2014) Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature, 511*(7511), pp. 557-62.
Dorr, J. M., Koorengevel, M. C., Schafer, M., Prokofyev, A. V., Scheidelaar, S., van der Cruijsen, E. A., Dafforn, T. R., Baldus, M. and Killian, J. A. (2014) Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K+ channel: the power of native nanodiscs. *Proc Natl Acad Sci U S A, 111*(52), pp. 18607-12.
Dorr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengevel, M. C., Dominguez, J. J., Schafer, M., van Walree, C. A. and Killian, J. A. (2016) The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur Biophys J, 45*(1), pp. 3-21.
Dorr, J. M., van Coevorden-Hameete, M. H., Hoogenraad, C. C. and Killian, J. A. (2017) Solubilization of human cells by the styrene-maleic acid copolymer: Insights from fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta Biomembr, 1859*(11), pp. 2155-2160.
Dotson, C. D., Geraedts, M. C. and Munger, S. D. (2013) Peptide regulators of peripheral taste function. *Semin Cell Dev Biol, 24*(3), pp. 232-9.
Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y. K., Vigues, S., Ott, S. H., Elson, A. E., Choi, H. J., Shaw, H., Egan, J. M., Mitchell, B. D., Li, X., Steinle, N. I. and Munger, S. D. (2008) Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One, 3*(12), pp. e3974.
Drake, S. L., Carunchia Whetstine, M. E., Drake, M. A., Courtney, P., Fligner, K., Jenkins, J. and Pruitt, C. (2007) Sources of umami taste in Cheddar and Swiss cheeses. *J Food Sci, 72*(6), pp. S360-6.
Dreses-Werringloer, U., Lambert, J. C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P., Davies, P., Foskett, J. K., Campagne, F. and Marambaud, P. (2008) A polymorphism in CALHM1 influences Ca2+ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell, 133*(7), pp. 1149-61.
Dror, R. O., Mildorf, T. J., Hilger, D., Manglik, A., Borhani, D. W., Arlow, D. H., Philippsen, A., Villanueva, N., Yang, Z., Lerch, M. T., Hubbell, W. L., Kobilka, B. K., Sunahara, R. K. and Shaw, D. E. (2015) SIGNAL TRANSDUCTION. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science, 348*(6241), pp. 1361-5.
Du, Y., Duc, N. M., Rasmussen, S. G. F., Hilger, D., Kubiak, X., Wang, L., Bohon, J., Kim, H. R., Wegrecki, M., Asuru, A., Jeong, K. M., Lee, J., Chance, M. R., Lodowski, D. T., Kobilka, B. K. and Chung, K. Y. (2019) Assembly of a GPCR-G Protein Complex. *Cell, 177*(5), pp. 1232-1242.e11.
DuBois, G. E. and Prakash, I. (2012) Non-caloric sweeteners, sweetness modulators, and sweetener enhancers. *Annu Rev Food Sci Technol, 3*, pp. 353-80.
Dupriez, V. J., Maes, K., Le Poul, E., Burgeon, E. and Detheux, M. (2002) Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. *Receptors Channels, 8*(5-6), pp. 319-30.
Dyer, J., Salmon, K. S., Zibrik, L. and Shirazi-Beechey, S. P. (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans, 33*(Pt 1), pp. 302-5.
Eglen, R. M. and Reisine, T. (2008) Photoproteins: important new tools in drug discovery. *Assay Drug Dev Technol, 6*(5), pp. 659-71.
Ekstrand, B., Young, J. F. and Rasmussen, M. K. (2017) Taste receptors in the gut - A new target for health promoting properties in diet. *Food Res Int, 100*(Pt 2), pp. 1-8.
Emmerstorfer-Augustin, A., Wriessnegger, T., Hirz, M., Zellnig, G. and Pichler, H. (2019) Membrane Protein Production in Yeast: Modification of Yeast Membranes for Human Membrane Protein Production. *Methods Mol Biol, 1923*, pp. 265-285.
Eny, K. M., Wolever, T. M., Corey, P. N. and El-Sohemy, A. (2010) Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. *Am J Clin Nutr, 92*(6), pp. 1501-10.
Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol, 5*(12), pp. 3610-6.
Faas, R., Kiefer, D., Job, L., Pohle, A., Moss, K., Henkel, M. and Hausmann, R. (2018) Time-course and degradation rate of membrane scaffold protein (MSP1D1) during recombinant production. *Biotechnol Rep (Amst), 17*, pp. 45-48.
Farbman, A. I. (1980) Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet, 13*(4), pp. 349-57.

Fernandez-Leiro, R. and Scheres, S. H. (2016) Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. *Nature, 537*(7620), pp. 339-46.
Fiala, G. J., Schamel, W. W. and Blumenthal, B. (2011) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J Vis Exp,* (48).
Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A. and Wigler, M. (1988) Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from Saccharomyces cerevisiae by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol, 8*(5), pp. 2159-65.
Fierro, F., Suku, E., Alfonso-Prieto, M., Giorgetti, A., Cichon, S. and Carloni, P. (2017) Agonist Binding to Chemosensory Receptors: A Systematic Bioinformatics Analysis. *Front Mol Biosci, 4*, pp. 63.
Finger, T. E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H. and Silver, W. L. (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(15), pp. 8981-6.
Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., Hellekant, G. and Kinnamon, S. C. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science, 310*(5753), pp. 1495-9.
Foster, S. R., Porrello, E. R., Purdue, B., Chan, H. W., Voigt, A., Frenzel, S., Hannan, R. D., Moritz, K. M., Simmons, D. G., Molenaar, P., Roura, E., Boehm, U., Meyerhof, W. and Thomas, W. G. (2013) Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One, 8*(5), pp. e64579.
Frank, M. (1973) An analysis of hamster afferent taste nerve response functions. *J Gen Physiol, 61*(5), pp. 588-618.
Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol, 63*(6), pp. 1256-72.
Frerot, E. and Escher, S. (1998) Flavored products and a process for their preparation in SA, F., (ed.): Firmenich SA
Fujii, Y., Kaneko, M., Neyazaki, M., Nogi, T., Kato, Y. and Takagi, J. (2014) PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin. *Protein Expr Purif, 95*, pp. 240-7.
Fujii, Y., Kaneko, M. K. and Kato, Y. (2016) MAP Tag: A Novel Tagging System for Protein Purification and Detection. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy, 35*(6), pp. 293-299.
Fujikura, K. (2015) Multiple loss-of-function variants of taste receptors in modern humans. *Sci Rep, 5*, pp. 12349.
Fushan, A. A., Simons, C. T., Slack, J. P., Manichaikul, A. and Drayna, D. (2009) Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol, 19*(15), pp. 1288-93.
Gaida, M. M., Mayer, C., Dapunt, U., Stegmaier, S., Schirmacher, P., Wabnitz, G. H. and Hansch, G. M. (2016) Expression of the bitter receptor T2R38 in pancreatic cancer: localization in lipid droplets and activation by a bacteria-derived quorum-sensing molecule. *Oncotarget, 7*(11), pp. 12623-32.
Galindo-Cuspinera, V. and Breslin, P. A. (2006) The liaison of sweet and savory. *Chem Senses, 31*(3), pp. 221-5.
Galindo, M. M., Voigt, N., Stein, J., van Lengerich, J., Raguse, J. D., Hofmann, T., Meyerhof, W. and Behrens, M. (2012) G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem Senses, 37*(2), pp. 123-39.
Ganchrow, J. R., Steiner, J. E. and Canetto, S. (1986) Behavioral displays to gustatory stimuli in newborn rat pups. *Dev Psychobiol, 19*(3), pp. 163-74.
Garcia-Bailo, B., Toguri, C., Eny, K. M. and El-Sohemy, A. (2009) Genetic variation in taste and its influence on food selection. *Omics, 13*(1), pp. 69-80.
Geng, Y., Xiong, D., Mosyak, L., Malito, D. L., Kniazeff, J., Chen, Y., Burmakina, S., Quick, M., Bush, M., Javitch, J. A., Pin, J. P. and Fan, Q. R. (2012) Structure and functional interaction of the extracellular domain of human GABA(B) receptor GBR2. *Nat Neurosci, 15*(7), pp. 970-8.
Gerbe, F. and Jay, P. (2016) Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol, 9*(6), pp. 1353-1359.
Gerhold, K. A. and Bautista, D. M. (2009) Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci, 1170*, pp. 184-9.
Gilbertson, T. A. and Khan, N. A. (2014) Cell signaling mechanisms of oro-gustatory detection of dietary fat: advances and challenges. *Prog Lipid Res, 53*, pp. 82-92.
Glendinning, J. I. (1994) Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiol Behav, 56*(6), pp. 1217-27.
Goehring, A., Lee, C. H., Wang, K. H., Michel, J. C., Claxton, D. P., Baconguis, I., Althoff, T., Fischer, S., Garcia, K. C. and Gouaux, E. (2014) Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nat Protoc, 9*(11), pp. 2574-85.
Goldsmith, P. K., Fan, G. F., Ray, K., Shiloach, J., McPhie, P., Rogers, K. V. and Spiegel, A. M. (1999) Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. *J Biol Chem, 274*(16), pp. 11303-9.
Goncalves, J. A., Ahuja, S., Erfani, S., Eilers, M. and Smith, S. O. (2010) Structure and function of G protein-coupled receptors using NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 57*(2), pp. 159-80.
Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol, 36*(1), pp. 59-74.
Greasley, P. J. and Jansen, F. P. (2005) G-protein-coupled receptor screening technologies. *Drug Discov Today Technol, 2*(2), pp. 163-70.
Greene, T. A., Alarcon, S., Thomas, A., Berdougo, E., Doranz, B. J., Breslin, P. A. and Rucker, J. B. (2011) Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. *PLoS One, 6*(5), pp. e20123.
Greenfield, N. J. (2006a) Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nat Protoc, 1*(6), pp. 2733-41.
Greenfield, N. J. (2006b) Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc, 1*(6), pp. 2527-35.
Greenfield, N. J. (2006c) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc, 1*(6), pp. 2876-90.

Grigorov, M. G., Schlichtherle-Cerny, H., Affolter, M. and Kochhar, S. (2003) Design of virtual libraries of umami-tasting molecules. *J Chem Inf Comput Sci, 43*(4), pp. 1248-58.
Grushevskyi, E. O., Kukaj, T., Schmauder, R., Bock, A., Zabel, U., Schwabe, T., Benndorf, K. and Lohse, M. J. (2019) Stepwise activation of a class C GPCR begins with millisecond dimer rearrangement. *116*(20), pp. 10150-10155.
Hacker, D. L. and Balasubramanian, S. (2016) Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Curr Opin Struct Biol, 38*, pp. 129-36.
Halpern, B. P. (1998) Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl. *Neurosci Biobehav Rev, 23*(1), pp. 5-47.
Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. A., Li, H., Choi, B. K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R. R., Hoopes, J., Wildt, S. and Gerngross, T. U. (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science, 313*(5792), pp. 1441-3.
Hamosh, M. (1990) Lingual and gastric lipases. *Nutrition, 6*(6), pp. 421-8.
Hansen, K. B. and Brauner-Osborne, H. (2009) FLIPR assays of intracellular calcium in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol, 552*, pp. 269-78.
Hartmann, L., Kugler, V. and Wagner, R. (2016) Expression of Eukaryotic Membrane Proteins in Pichia pastoris. *Methods Mol Biol, 1432*, pp. 143-62.
Hashimoto, K., Murata, J., Konishi, T., Yabe, I., Nakamatsu, T. and Kawasaki, H. (2012) Glutamate is excreted across the cytoplasmic membrane through the NCgl1221 channel of Corynebacterium glutamicum by passive diffusion. *Biosci Biotechnol Biochem, 76*(7), pp. 1422-4.
Hass, N., Schwarzenbacher, K. and Breer, H. (2010) T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res, 339*(3), pp. 493-504.
He, M. L., Zemkova, H., Koshimizu, T. A., Tomic, M. and Stojilkovic, S. S. (2003) Intracellular calcium measurements as a method in studies on activity of purinergic P2X receptor channels. *Am J Physiol Cell Physiol, 285*(2), pp. C467-79.
Healey, R. D., Lebhar, H., Hornung, S., Thordarson, P. and Marquis, C. P. (2017) An improved process for the production of highly purified recombinant thaumatin tagged-variants. *Food Chem, 237*, pp. 825-832.
Hellekant, G., Schmolling, J., Marambaud, P. and Rose-Hellekant, T. A. (2015) CALHM1 Deletion in Mice Affects Glossopharyngeal Taste Responses, Food Intake, Body Weight, and Life Span. *Chem Senses, 40*(6), pp. 373-9.
Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Stahler, F., Meyerhof, W. and Hofmann, T. (2012) Human psychometric and taste receptor responses to steviol glycosides. *J Agric Food Chem, 60*(27), pp. 6782-93.
Heydel, J. M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A. M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J. and Briand, L. (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec (Hoboken), 296*(9), pp. 1333-45.
Heydel, J. M., Faure, P. and Neiers, F. (2019) Nasal odorant metabolism: enzymes, activity and function in olfaction. *Drug Metab Rev, 51*(2), pp. 224-245.
Hofmann, T. (2009) Identification of the Key Bitter Compounds in Our Daily Diet Is a Prerequisite for the Understanding of the hTAS2R Gene Polymorphisms Affecting Food Choice. *Ann N Y Acad Sci, 1170*(1), pp. 116-125.
Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell, 96*(4), pp. 541-51.
Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., Urdal, D. L. and Conlon, P. J. (1988) A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/technology (Nature Publishing Company), 6*, pp. 1204-1210.
Horn, F., Bettler, E., Oliveira, L., Campagne, F., Cohen, F. E. and Vriend, G. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res, 31*(1), pp. 294-7.
Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D. and Garrett, W. S. (2016) Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science, 351*(6279), pp. 1329-33.
Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F. and Zeng, B. (2018) Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs, 205*(1), pp. 1-8.
Hu, J., Hauache, O. and Spiegel, A. M. (2000) Human Ca2+ receptor cysteine-rich domain Analysis of function of mutant and chimeric receptors. *Journal of Biological Chemistry, 275*(21), pp. 16382-16389.
Hu, J., Reyes-Cruz, G., Chen, W., Jacobson, K. A. and Spiegel, A. M. (2002) Identification of acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca2+ receptor critical for response to Ca2+ and a positive allosteric modulator. *J Biol Chem, 277*(48), pp. 46622-31.
Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature, 442*(7105), pp. 934-8.
Huang, L., Shanker, Y. G., Dubauskaite, J., Zheng, J. Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A. I., Max, M. and Margolskee, R. F. (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci, 2*(12), pp. 1055-62.
Huang, Y. J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N. and Roper, S. D. (2007) The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(15), pp. 6436-41.
Humiski, L. M. and Aluko, R. E. (2007) Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *J Food Sci, 72*(8), pp. S605-11.
Ide, N., Masuda, T. and Kitabatake, N. (2007) Effects of pre- and pro-sequence of thaumatin on the secretion by Pichia pastoris. *Biochem Biophys Res Commun, 363*(3), pp. 708-14.

Ilegems, E., Iwatsuki, K., Kokrashvili, Z., Benard, O., Ninomiya, Y. and Margolskee, R. F. (2010) REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J Neurosci, 30*(41), pp. 13774-83.
Inouye, S. (2008) Cloning, expression, purification and characterization of an isotype of clytin, a calcium-binding photoprotein from the luminous hydromedusa Clytia gregarium. *J Biochem, 143*(5), pp. 711-7.
Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T. and Tsuji, F. I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A, 82*(10), pp. 3154-8.
Isaksson, L., Enberg, J., Neutze, R., Goran Karlsson, B. and Pedersen, A. (2012) Expression screening of membrane proteins with cell-free protein synthesis. *Protein Expr Purif, 82*(1), pp. 218-25.
Ishimaru, Y. (2015) Molecular mechanisms underlying the reception and transmission of sour taste information. *Biosci Biotechnol Biochem, 79*(2), pp. 171-6.
Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M. and Matsunami, H. (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(33), pp. 12569-74.
Jacobsen, S. E., Gether, U. and Brauner-Osborne, H. (2017) Investigating the molecular mechanism of positive and negative allosteric modulators in the calcium-sensing receptor dimer. *Sci Rep, 7*, pp. 46355.
Jager, V., Bussow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A. and Schirrmann, T. (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol, 13*, pp. 52.
Jaggupilli, A., Singh, N., Upadhyaya, J., Sikarwar, A. S., Arakawa, M., Dakshinamurti, S., Bhullar, R. P., Duan, K. and Chelikani, P. (2017) Analysis of the expression of human bitter taste receptors in extraoral tissues. *Mol Cell Biochem, 426*(1-2), pp. 137-147.
Jamshad, M., Charlton, J., Lin, Y.-P., Routledge, S. J., Bawa, Z., Knowles, T. J., Overduin, M., Dekker, N., Dafforn, T. R., Bill, R. M., Poyner, D. R. and Wheatley, M. (2015) G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent. *Bioscience reports, 35*(2), pp. e00188.
Jang, H. J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M. J., Carlson, O. D., Kim, B. J., Zhou, J., Kim, H. H., Xu, X., Chan, S. L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R. F. and Egan, J. M. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(38), pp. 15069-74.
Jarvis, D. L., Kawar, Z. S. and Hollister, J. R. (1998) Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Curr Opin Biotechnol, 9*(5), pp. 528-33.
Jia, L., Tu, T., Huai, Q., Sun, J., Chen, S., Li, X. and Shi, Z. (2017) Enhancing monellin production by Pichia pastoris at low cell induction concentration via effectively regulating methanol metabolism patterns and energy utilization efficiency. *12*(10), pp. e0184602.
Jiang, P., Cui, M., Ji, Q., Snyder, L., Liu, Z., Benard, L., Margolskee, R. F., Osman, R. and Max, M. (2005a) Molecular mechanisms of sweet receptor function. *Chem Senses, 30 Suppl 1*, pp. i17-8.
Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., Margolskee, R. F. and Max, M. (2005b) Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem, 280*(15), pp. 15238-46.
Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Margolskee, R. F. and Max, M. (2004) The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem, 279*(43), pp. 45068-75.
Jiang, P., Josue, J., Li, X., Glaser, D., Li, W., Brand, J. G., Margolskee, R. F., Reed, D. R. and Beauchamp, G. K. (2012) Major taste loss in carnivorous mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A, 109*(13), pp. 4956-61.
Jiang, Y., Gong, N. N. and Matsunami, H. (2014) Astringency: a more stringent definition. *Chem Senses, 39*(6), pp. 467-9.
Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sorensen, T. L., Moller, J. V., le Maire, M., Nissen, P. and Jaxel, C. (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(33), pp. 11687-91.
Johnson, M. (2019) Protein/Peptide Tags. *Materials and Methods, 2*, pp. 116.
Kaneko, S., Kumazawa, K., Masuda, H., Henze, A. and Hofmann, T. (2006) Molecular and sensory studies on the umami taste of Japanese green tea. *J Agric Food Chem, 54*(7), pp. 2688-94.
Kashani-Amin, E., Sakhteman, A., Larijani, B. and Ebrahim-Habibi, A. (2019) Introducing a New Model of Sweet Taste Receptor, a Class C G-protein Coupled Receptor (C GPCR). *77*(3), pp. 227-243.
Kawai, M., Okiyama, A. and Ueda, Y. (2002) Taste enhancements between various amino acids and IMP. *Chem Senses, 27*(8), pp. 739-45.
Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta, 1751*(2), pp. 119-39.
Kelly, S. M. and Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci, 1*(4), pp. 349-84.
Khan, K. H. (2013) Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3*(2), pp. 257-263.
Kikhney, A. G. and Svergun, D. I. (2015) A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett, 589*(19 Pt A), pp. 2570-7.
Kikut-Ligaj, D. and Trzcielinska-Lorych, J. (2015) How taste works: cells, receptors and gustatory perception. *Cell Mol Biol Lett, 20*(5), pp. 699-716.
Kim, H. O. and Li-Chan, E. C. (2006) Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J Agric Food Chem, 54*(26), pp. 10102-11.
Kim, K. S., Egan, J. M. and Jang, H. J. (2014) Denatonium induces secretion of glucagon-like peptide-1 through activation of bitter taste receptor pathways. *Diabetologia, 57*(10), pp. 2117-25.
Kim, U. K., Breslin, P. A., Reed, D. and Drayna, D. (2004) Genetics of human taste perception. *J Dent Res, 83*(6), pp. 448-53.

Kim, U. K., Wooding, S., Riaz, N., Jorde, L. B. and Drayna, D. (2006) Variation in the human TAS1R taste receptor genes. *Chem Senses, 31*(7), pp. 599-611.
Kimura-Soyema, T., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2014) Cell-free membrane protein expression. *Methods Mol Biol, 1118*, pp. 267-73.
Kinnamon, S. C. (2012) Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf), 204*(2), pp. 158-68.
Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A. (2001) Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun, 283*(1), pp. 236-42.
Kitson, S. M., Mullen, W., Cogdell, R. J., Bill, R. M. and Fraser, N. J. (2011) GPCR production in a novel yeast strain that makes cholesterol-like sterols. *Methods, 55*(4), pp. 287-92.
Kiuchi, S., Yamada, T., Kiyokawa, N., Saito, T., Fujimoto, J. and Yasue, H. (2006) Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res, 115*(1), pp. 51-61.
Klein-Schwartz, W. (1991) Denatonium benzoate: review of efficacy and safety. *Vet Hum Toxicol, 33*(6), pp. 545-7.
Kniazeff, J., Galvez, T., Labesse, G. and Pin, J. P. (2002) No ligand binding in the GB2 subunit of the GABA(B) receptor is required for activation and allosteric interaction between the subunits. *J Neurosci, 22*(17), pp. 7352-61.
Kniazeff, J., Prezeau, L., Rondard, P., Pin, J. P. and Goudet, C. (2011) Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol Ther, 130*(1), pp. 9-25.
Knowles, T. J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y. P., Dafforn, T. and Overduin, M. (2009) Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J Am Chem Soc, 131*(22), pp. 7484-5.
Kock, K., Ahlers, C. and Schmale, H. (1994) Structural organization of the genes for rat von Ebner's gland proteins 1 and 2 reveals their close relationship to lipocalins. *Eur J Biochem, 221*(3), pp. 905-16.
Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M. J., Chu, M., Kobilka, T. S., Laeremans, T., Steyaert, J., Tarrasch, J., Dutta, S., Fonseca, R., Weis, W. I., Mathiesen, J. M., Skiniotis, G. and Kobilka, B. K. (2019) Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature, 566*(7742), pp. 79-84.
Kokrashvili, Z., Mosinger, B. and Margolskee, R. F. (2009) T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci, 1170*, pp. 91-4.
Kondoh, T. and Torii, K. (2008) MSG intake suppresses weight gain, fat deposition, and plasma leptin levels in male Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav, 95*(1-2), pp. 135-44.
Kong, Y., Yang, X., Ding, Q., Zhang, Y. Y., Sun, B. G., Chen, H. T. and Sun, Y. (2017) Comparison of non-volatile umami components in chicken soup and chicken enzymatic hydrolysate. *Food Res Int, 102*, pp. 559-566.
Korepanova, A. and Matayoshi, E. D. (2012) HPLC-SEC characterization of membrane protein-detergent complexes. *Curr Protoc Protein Sci, Chapter 29*, pp. Unit 29.5.1-12.
Kostenis, E., Waelbroeck, M. and Milligan, G. (2005) Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci, 26*(11), pp. 595-602.
Kubasova, N., Burdakov, D. and Domingos, A. I. (2015) Sweet and Low on Leptin: Hormonal Regulation of Sweet Taste Buds. *Diabetes, 64*(11), pp. 3651-2.
Kuhn, C., Bufe, B., Batram, C. and Meyerhof, W. (2010) Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses, 35*(5), pp. 395-406.
Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., Lewtschenko, T., Slack, J. P., Ward, C. D. and Meyerhof, W. (2004) Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci, 24*(45), pp. 10260-5.
Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H. and Morikawa, K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature, 407*(6807), pp. 971-7.
Kurihara, K. (2015) Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *Biomed Res Int, 2015*, pp. 189402.
Kurihara, K. and Kashiwayanagi, M. (2000) Physiological studies on umami taste. *J Nutr, 130*(4S Suppl), pp. 931s-4s.
Kurobayashi, Y., Katsumi, Y., Fujita, A., Morimitsu, Y. and Kubota, K. (2008) Flavor enhancement of chicken broth from boiled celery constituents. *J Agric Food Chem, 56*(2), pp. 512-6.
Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Kai, Y., Mizukoshi, T., Miyano, H. and Eto, Y. (2012) Determination and quantification of gamma-glutamyl-valyl-glycine in commercial fish sauces. *J Agric Food Chem, 60*(29), pp. 7291-6.
Laffitte, A., Belloir, C., Poirier, N., Neiers, F. and Briand, L. (in preparation) Functional characterization of the Venus Flytrap domain of the human TAS1R2 sweet taste receptor
Laffitte, A., Neiers, F. and Briand, L. (2014) Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 17*(4), pp. 379-85.
Lagerstrom, M. C. and Schioth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov, 7*(4), pp. 339-57.
Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P. and Besnard, P. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest, 115*(11), pp. 3177-84.
Lawton, D. M., Furness, D. N., Lindemann, B. and Hackney, C. M. (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci, 12*(9), pp. 3163-71.
Le Bon, C., Marconnet, A., Masscheleyn, S., Popot, J. L. and Zoonens, M. (2018) Folding and stabilizing membrane proteins in amphipol A8-35. *Methods, 147*, pp. 95-105.
le Maire, M., Champeil, P. and Moller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta, 1508*(1-2), pp. 86-111.
Le Poul, E., Hisada, S., Mizuguchi, Y., Dupriez, V. J., Burgeon, E. and Detheux, M. (2002) Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening. *J Biomol Screen, 7*(1), pp. 57-65.

Leach, K. and Gregory, K. J. (2017) Molecular insights into allosteric modulation of Class C G protein-coupled receptors. *Pharmacol Res, 116*, pp. 105-118.
Lee, J. W., Joshi, S., Chan, J. S. and Wong, Y. H. (1998) Differential coupling of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors to G alpha16-mediated stimulation of phospholipase C. *J Neurochem, 70*(5), pp. 2203-11.
Lee, S., Mao, A., Bhattacharya, S., Robertson, N., Grisshammer, R., Tate, C. G. and Vaidehi, N. (2016) How Do Short Chain Nonionic Detergents Destabilize G-Protein-Coupled Receptors? *J Am Chem Soc, 138*(47), pp. 15425-15433.
Lee, S. M., Booe, J. M. and Pioszak, A. A. (2015) Structural insights into ligand recognition and selectivity for classes A, B, and C GPCRs. *Eur J Pharmacol, 763*(Pt B), pp. 196-205.
Lee, Y., Basith, S. and Choi, S. (2018) Recent Advances in Structure-Based Drug Design Targeting Class A G Protein-Coupled Receptors Utilizing Crystal Structures and Computational Simulations. *61*(1), pp. 1-46.
Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Koivunen, P. and Rajaniemi, H. (2001) Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. *J Histochem Cytochem, 49*(5), pp. 657-62.
Lemon, C. H. and Katz, D. B. (2007) The neural processing of taste. *BMC Neurosci, 8 Suppl 3*, pp. S5.
Li, F. (2013) Taste perception: from the tongue to the testis. *Mol Hum Reprod, 19*(6), pp. 349-60.
Li, R., Fan, W., Tian, G., Zhu, H., He, L., Cai, J., Huang, Q., Cai, Q., Li, B., Bai, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, W., Li, J., Wei, F., Li, H., Jian, M., Li, J., Zhang, Z., Nielsen, R., Li, D., Gu, W., Yang, Z., Xuan, Z., Ryder, O. A., Leung, F. C., Zhou, Y., Cao, J., Sun, X., Fu, Y., Fang, X., Guo, X., Wang, B., Hou, R., Shen, F., Mu, B., Ni, P., Lin, R., Qian, W., Wang, G., Yu, C., Nie, W., Wang, J., Wu, Z., Liang, H., Min, J., Wu, Q., Cheng, S., Ruan, J., Wang, M., Shi, Z., Wen, M., Liu, B., Ren, X., Zheng, H., Dong, D., Cook, K., Shan, G., Zhang, H., Kosiol, C., Xie, X., Lu, Z., Zheng, H., Li, Y., Steiner, C. C., Lam, T. T., Lin, S., Zhang, Q., Li, G., Tian, J., Gong, T., Liu, H., Zhang, D., Fang, L., Ye, C., Zhang, J., Hu, W., Xu, A., Ren, Y., Zhang, G., Bruford, M. W., Li, Q., Ma, L., Guo, Y., An, N., Hu, Y., Zheng, Y., Shi, Y., Li, Z., Liu, Q., Chen, Y., Zhao, J., Qu, N., Zhao, S., Tian, F., Wang, X., Wang, H., Xu, L., Liu, X., Vinar, T., Wang, Y., Lam, T. W., Yiu, S. M., Liu, S., Zhang, H., Li, D., Huang, Y., Wang, X., Yang, G., Jiang, Z., Wang, J., Qin, N., Li, L., Li, J., Bolund, L., Kristiansen, K., Wong, G. K., Olson, M., Zhang, X., Li, S., Yang, H., Wang, J. and Wang, J. (2010) The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. *Nature, 463*(7279), pp. 311-7.
Li, X., Inoue, M., Reed, D. R., Huque, T., Puchalski, R. B., Tordoff, M. G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G. K. and Bachmanov, A. A. (2001) High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mamm Genome, 12*(1), pp. 13-6.
Li, X., Li, W., Wang, H., Cao, J., Maehashi, K., Huang, L., Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Legrand-Defretin, V., Beauchamp, G. K. and Brand, J. G. (2005) Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet, 1*(1), pp. 27-35.
Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(7), pp. 4692-6.
Lim, J. and Lawless, H. T. (2005) Qualitative differences of divalent salts: multidimensional scaling and cluster analysis. *Chem Senses, 30*(9), pp. 719-26.
Liman, E. R., Zhang, Y. V. and Montell, C. (2014) Peripheral coding of taste. *Neuron, 81*(5), pp. 984-1000.
Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. and Callewaert, N. (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun, 5*, pp. 4767-4767.
Liu, A. M., Ho, M. K., Wong, C. S., Chan, J. H., Pau, A. H. and Wong, Y. H. (2003) Galpha(16/z) chimeras efficiently link a wide range of G protein-coupled receptors to calcium mobilization. *J Biomol Screen, 8*(1), pp. 39-49.
Liu, B., Ha, M., Meng, X. Y., Kaur, T., Khaleduzzaman, M., Zhang, Z., Jiang, P., Li, X. and Cui, M. (2011) Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners. *J Neurosci, 31*(30), pp. 11070-6.
Liu, H. X., Ermilov, A., Grachtchouk, M., Li, L., Gumucio, D. L., Dlugosz, A. A. and Mistretta, C. M. (2013) Multiple Shh signaling centers participate in fungiform papilla and taste bud formation and maintenance. *Dev Biol, 382*(1), pp. 82-97.
Liu, J., Yan, D. Z. and Zhao, S. J. (2015) Expression of monellin in a food-grade delivery system in Saccharomyces cerevisiae. *J Sci Food Agric, 95*(13), pp. 2646-51.
Liu, J., Zhang, Z., Moreno-Delgado, D., Dalton, J. A., Rovira, X., Trapero, A., Goudet, C., Llebaria, A., Giraldo, J., Yuan, Q., Rondard, P., Huang, S., Liu, J. and Pin, J.-P. (2017) Allosteric control of an asymmetric transduction in a G protein-coupled receptor heterodimer. *Elife, 6*, pp. e26985.
Liu, K., Jaggupilli, A., Premnath, D. and Chelikani, P. (2018) Plasticity of the ligand binding pocket in the bitter taste receptor T2R7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1860*(5), pp. 991-999.
Liu, X., Xu, X., Hilger, D., Aschauer, P., Tiemann, J. K. S., Du, Y., Liu, H., Hirata, K., Sun, X., Guixa-Gonzalez, R., Mathiesen, J. M., Hildebrand, P. W. and Kobilka, B. K. (2019) Structural Insights into the Process of GPCR-G Protein Complex Formation. *Cell, 177*(5), pp. 1243-1251.e12.
Logez, C., Damian, M., Legros, C., Dupre, C., Guery, M., Mary, S., Wagner, R., M'Kadmi, C., Nosjean, O., Fould, B., Marie, J., Fehrentz, J. A., Martinez, J., Ferry, G., Boutin, J. A. and Baneres, J. L. (2016) Detergent-free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry, 55*(1), pp. 38-48.
Lossow, K., Hubner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M. and Meyerhof, W. (2016) Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J Biol Chem, 291*(29), pp. 15358-77.
Lu, P. and Zhang, C. H. (2017) Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *149*(2), pp. 181-197.
Mace, O. J., Lister, N., Morgan, E., Shepherd, E., Affleck, J., Helliwell, P., Bronk, J. R., Kellett, G. L., Meredith, D., Boyd, R., Pieri, M., Bailey, P. D., Pettcrew, R. and Foley, D. (2009) An energy supply network of nutrient

absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol, 587*(1), pp. 195-210.
Madsen, H. B. and Ahmed, S. H. (2015) Drug versus sweet reward: greater attraction to and preference for sweet versus drug cues. *Addict Biol, 20*(3), pp. 433-44.
Maga, J. A. (1983) Flavor potentiators. *Crit Rev Food Sci Nutr, 18*(3), pp. 231-312.
Maillet, E. L., Cui, M., Jiang, P., Mezei, M., Hecht, E., Quijada, J., Margolskee, R. F., Osman, R. and Max, M. (2015) Characterization of the Binding Site of Aspartame in the Human Sweet Taste Receptor. *Chem Senses, 40*(8), pp. 577-86.
Mainland, J. and Matsunami, H. (2012) RAMP like proteins : RTP and REEP family of proteins. *Adv Exp Med Biol, 744*, pp. 75-86.
Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2012) Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. *Protein Expr Purif, 83*(1), pp. 75-83.
Maitrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L. and Briand, L. (2013) An efficient Escherichia coli expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered, 4*(1), pp. 25-9.
Malherbe, P., Kratochwil, N., Knoflach, F., Zenner, M. T., Kew, J. N., Kratzeisen, C., Maerki, H. P., Adam, G. and Mutel, V. (2003a) Mutational analysis and molecular modeling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor. *J Biol Chem, 278*(10), pp. 8340-7.
Malherbe, P., Kratochwil, N., Zenner, M. T., Piussi, J., Diener, C., Kratzeisen, C., Fischer, C. and Porter, R. H. (2003b) Mutational analysis and molecular modeling of the binding pocket of the metabotropic glutamate 5 receptor negative modulator 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine. *Mol Pharmacol, 64*(4), pp. 823-32.
Malhotra, A. (2009) Tagging for protein expression. *Methods Enzymol, 463*, pp. 239-58.
Maluly, H. D. B., Arisseto-Bragotto, A. P. and Reyes, F. G. R. (2017) Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. *Food Sci Nutr, 5*(6), pp. 1039-1048.
Marchiori, A., Capece, L., Giorgetti, A., Gasparini, P., Behrens, M., Carloni, P. and Meyerhof, W. (2013) Coarse-grained/molecular mechanics of the TAS2R38 bitter taste receptor: experimentally-validated detailed structural prediction of agonist binding. *PLoS One, 8*(5), pp. e64675.
Margolskee, R. F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem, 277*(1), pp. 1-4.
Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K. S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E. L., Ninomiya, Y., Mosinger, B. and Shirazi-Beechey, S. P. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na+-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(38), pp. 15075-80.
Marheineke, K., Grunewald, S., Christie, W. and Reilander, H. (1998) Lipid composition of Spodoptera frugiperda (Sf9) and Trichoplusia ni (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett, 441*(1), pp. 49-52.
Markus, C. R., Rogers, P. J., Brouns, F. and Schepers, R. (2017) Eating dependence and weight gain; no human evidence for a 'sugar-addiction' model of overweight. *Appetite, 114*, pp. 64-72.
Martin, L. T. P., Nachtigal, M. W., Selman, T., Nguyen, E., Salsman, J., Dellaire, G. and Dupre, D. J. (2019) Bitter taste receptors are expressed in human epithelial ovarian and prostate cancers cells and noscapine stimulation impacts cell survival. *454*(1-2), pp. 203-214.
Martins, S. A., Trabuco, J. R., Monteiro, G. A., Chu, V., Conde, J. P. and Prazeres, D. M. (2012) Towards the miniaturization of GPCR-based live-cell screening assays. *Trends Biotechnol, 30*(11), pp. 566-74.
Maruyama, Y., Pereira, E., Margolskee, R. F., Chaudhari, N. and Roper, S. D. (2006) Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *J Neurosci, 26*(8), pp. 2227-34.
Maruyama, Y., Yasuda, R., Kuroda, M. and Eto, Y. (2012) Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS One, 7*(4), pp. e34489.
Masic, U. and Yeomans, M. R. (2014a) Monosodium glutamate delivered in a protein-rich soup improves subsequent energy compensation. *J Nutr Sci, 3*, pp. e15.
Masic, U. and Yeomans, M. R. (2014b) Umami flavor enhances appetite but also increases satiety. *Am J Clin Nutr, 100*(2), pp. 532-8.
Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T. and Ishiguro, M. (2012) Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS One, 7*(4), pp. e35380.
Masuda, T., Kigo, S., Mitsumoto, M., Ohta, K., Suzuki, M., Mikami, B., Kitabatake, N. and Tani, F. (2018) Positive Charges on the Surface of Thaumatin Are Crucial for the Multi-Point Interaction with the Sweet Receptor. *Front Mol Biosci, 5*, pp. 10.
Masuda, T., Ohta, K., Ojiro, N., Murata, K., Mikami, B., Tani, F., Temussi, P. A. and Kitabatake, N. (2016) A Hypersweet Protein: Removal of The Specific Negative Charge at Asp21 Enhances Thaumatin Sweetness. *Sci Rep, 6*, pp. 20255.
Masuda, T., Okubo, K., Murata, K., Mikami, B., Sugahara, M., Suzuki, M., Temussi, P. A. and Tani, F. (2019) Subatomic structure of hyper-sweet thaumatin D21N mutant reveals the importance of flexible conformations for enhanced sweetness. *Biochimie, 157*, pp. 57-63.
Matsunami, H., Montmayeur, J. P. and Buck, L. B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature, 404*(6778), pp. 601-4.
Mattes, R. D. (2009) Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr, 29*, pp. 305-27.
Max, M., Shanker, Y. G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. and Margolskee, R. F. (2001) Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet, 28*(1), pp. 58-63.
McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. and Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature, 416*(6876), pp. 52-8.
McKenzie, E. A. and Abbott, W. M. (2018) Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells. *Methods, 147*, pp. 40-49.

Mertens, H. D. and Svergun, D. I. (2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J Struct Biol, 172*(1), pp. 128-41.
Meyerhof, W. (2005) Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev Physiol Biochem Pharmacol, 154*, pp. 37-72.
Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G. and Behrens, M. (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses, 35*(2), pp. 157-70.
Michalke, K., Graviere, M. E., Huyghe, C., Vincentelli, R., Wagner, R., Pattus, F., Schroeder, K., Oschmann, J., Rudolph, R., Cambillau, C. and Desmyter, A. (2009) Mammalian G-protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: I. High-throughput large-scale production as inclusion bodies. *Anal Biochem, 386*(2), pp. 147-55.
Milic, D. and Veprintsev, D. B. (2015) Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Front Pharmacol, 6*, pp. 66.
Miller, I. J. and Spangler, K. M. (1982) Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. *Chem Senses, 7*(1), pp. 99-108.
Milligan, G. (2007) G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim Biophys Acta, 1768*(4), pp. 825-35.
Milligan, G., Marshall, F. and Rees, S. (1996) G16 as a universal G protein adapter: implications for agonist screening strategies. *Trends Pharmacol Sci, 17*(7), pp. 235-7.
Moller, T. C., Moreno-Delgado, D., Pin, J. P. and Kniazeff, J. (2017) Class C G protein-coupled receptors: reviving old couples with new partners. *Biophys Rep, 3*(4), pp. 57-63.
Montell, C. (2018) pHirst sour taste channels pHound? *Science, 359*(6379), pp. 991-992.
Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H. and Buck, L. B. (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci, 4*(5), pp. 492-8.
Montmayeur, J. P. and Matsunami, H. (2002) Receptors for bitter and sweet taste. *Curr Opin Neurobiol, 12*(4), pp. 366-71.
Morini, G., Bassoli, A. and Temussi, P. A. (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *J Med Chem, 48*(17), pp. 5520-9.
Murovets, V. O., Bachmanov, A. A. and Zolotarev, V. A. (2015) Impaired Glucose Metabolism in Mice Lacking the Tas1r3 Taste Receptor Gene. *PLoS One, 10*(6), pp. e0130997.
Murray, R. G. (1986) The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J Ultrastruct Mol Struct Res, 95*(1-3), pp. 175-88.
Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K. and Jingami, H. (2007a) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ligand-binding domain of metabotropic glutamate receptor 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 63*(Pt 7), pp. 627-30.
Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K. and Jingami, H. (2007b) Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(10), pp. 3759-64.
Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Shigemura, N., Ninomiya, Y. and Kojima, I. (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One, 4*(4), pp. e5106.
Nakamura, E., Torii, K. and Uneyama, H. (2008) Physiological roles of dietary free glutamate in gastrointestinal functions. *Biol Pharm Bull, 31*(10), pp. 1841-3.
Nango, E., Akiyama, S., Maki-Yonekura, S., Ashikawa, Y., Kusakabe, Y., Krayukhina, E., Maruno, T., Uchiyama, S., Nuemket, N., Yonekura, K., Shimizu, M., Atsumi, N., Yasui, N., Hikima, T., Yamamoto, M., Kobayashi, Y. and Yamashita, A. (2016) Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains. *Sci Rep, 6*, pp. 25745.
Naranjo, A. N., McNeely, P. M., Katsaras, J. and Robinson, A. S. (2016) Impact of purification conditions and history on A2A adenosine receptor activity: The role of CHAPS and lipids. *Protein Expr Purif, 124*, pp. 62-7.
Neiers, F., Canivenc-Lavier, M. C. and Briand, L. (2016) What Does Diabetes "Taste" Like? *Curr Diab Rep, 16*(6), pp. 49.
Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature, 416*(6877), pp. 199-202.
Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell, 106*(3), pp. 381-90.
Nelson, G. M. and Finger, T. E. (1993) Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J Comp Neurol, 336*(4), pp. 507-16.
Nettleship, J. E., Ren, J., Rahman, N., Berrow, N. S., Hatherley, D., Barclay, A. N. and Owens, R. J. (2008) A pipeline for the production of antibody fragments for structural studies using transient expression in HEK 293T cells. *Protein Expr Purif, 62*(1), pp. 83-9.
Nie, Y., Hobbs, J. R., Vigues, S., Olson, W. J., Conn, G. L. and Munger, S. D. (2006) Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. *Chem Senses, 31*(6), pp. 505-13.
Nie, Y., Vigues, S., Hobbs, J. R., Conn, G. L. and Munger, S. D. (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol, 15*(21), pp. 1948-52.
Nissim, I., Dagan-Wiener, A. and Niv, M. Y. (2017) The taste of toxicity: A quantitative analysis of bitter and toxic molecules. *69*(12), pp. 938-946.
Nogales, E. (2018) Profile of Joachim Frank, Richard Henderson, and Jacques Dubochet, 2017 Nobel Laureates in Chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A, 115*(3), pp. 441-444.
Nominé, Y. and Kieffer, B. (2012) Déterminer la structure d'une protéine par RMN : un problème d'optimisation complexe. *L'actualité chimique, 364-365*(RMN moléculaire).
Noreng, S. and Bharadwaj, A. (2018) Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *7*.
Nuemket, N., Yasui, N., Kusakabe, Y., Nomura, Y., Atsumi, N., Akiyama, S., Nango, E., Kato, Y., Kaneko, M. K., Takagi, J., Hosotani, M. and Yamashita, A. (2017) Structural basis for perception of diverse chemical substances by T1r taste receptors. *Nat Commun, 8*, pp. 15530.

O'Hara, P. J., Sheppard, P. O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B. A., McGrane, V., Houamed, K. M., Thomsen, C., Gilbert, T. L. and Mulvihill, E. R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron, 11*(1), pp. 41-52.

Offermanns, S. and Simon, M. I. (1995) G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem, 270*(25), pp. 15175-80.

Ohsu, T., Amino, Y., Nagasaki, H., Yamanaka, T., Takeshita, S., Hatanaka, T., Maruyama, Y., Miyamura, N. and Eto, Y. (2010) Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception. *J Biol Chem, 285*(2), pp. 1016-22.

Ohta, K., Masuda, T., Tani, F. and Kitabatake, N. (2011) The cysteine-rich domain of human T1R3 is necessary for the interaction between human T1R2-T1R3 sweet receptors and a sweet-tasting protein, thaumatin. *Biochem Biophys Res Commun, 406*(3), pp. 435-8.

Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2013) High salt recruits aversive taste pathways. *Nature, 494*(7438), pp. 472-5.

Orwick, M. C., Judge, P. J., Procek, J., Lindholm, L., Graziadei, A., Engel, A., Grobner, G. and Watts, A. (2012) Detergent-free formation and physicochemical characterization of nanosized lipid-polymer complexes: Lipodisq. *Angew Chem Int Ed Engl, 51*(19), pp. 4653-7.

Pagano, A., Ruegg, D., Litschig, S., Stoehr, N., Stierlin, C., Heinrich, M., Floersheim, P., Prezeau, L., Carroll, F., Pin, J. P., Cambria, A., Vranesic, I., Flor, P. J., Gasparini, F. and Kuhn, R. (2000) The non-competitive antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine and 7-hydroxyiminocyclopropan[b]chromen-1a-carboxylic acid ethyl ester interact with overlapping binding pockets in the transmembrane region of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem, 275*(43), pp. 33750-8.

Pankevych, H., Korkhov, V., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2003) Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling. *J Biol Chem, 278*(32), pp. 30283-93.

Park, J.-N., Fukumoto, Y., Fujita, E., Tanaka, T., Washio, T., Otsuka, S., Shimizu, T., Watanabe, K. and Abe, H. (2001) Chemical Composition of Fish Sauces Produced in Southeast and East Asian Countries. *Journal of Food Composition and Analysis, 14*(2), pp. 113-125.

Park, J., Selvam, B., Sanematsu, K., Shigemura, N., Shukla, D. and Procko, E. (2019) Structural architecture of a dimeric class C GPCR based on co-trafficking of sweet taste receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry, 294*(13), pp. 4759-4774.

Perea-Martinez, I., Nagai, T. and Chaudhari, N. (2013) Functional cell types in taste buds have distinct longevities. *PLoS One, 8*(1), pp. e53399.

Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., Max, M. and Margolskee, R. F. (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci, 5*(11), pp. 1169-76.

Petrel, C., Kessler, A., Dauban, P., Dodd, R. H., Rognan, D. and Ruat, M. (2004) Positive and Negative Allosteric Modulators of the Ca2+-sensing Receptor Interact within Overlapping but Not Identical Binding Sites in the Transmembrane Domain. *Journal of Biological Chemistry, 279*(18), pp. 18990-18997.

Pin, J. P., Galvez, T. and Prezeau, L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther, 98*(3), pp. 325-54.

Pioltine, M. B., de Melo, M. E. and Santos, A. S. (2018) Genetic Variations in Sweet Taste Receptor Gene Are Related to Chocolate Powder and Dietary Fiber Intake in Obese Children and Adolescents. *8*(1).

Poirier, N., Roudnitzky, N., Brockhoff, A., Belloir, C., Maison, M., Thomas-Danguin, T., Meyerhof, W. and Briand, L. (2012) Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast Pichia pastoris. *J Agric Food Chem, 60*(39), pp. 9807-14.

Popot, J. L., Althoff, T., Bagnard, D., Baneres, J. L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L. J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M. J., Cremel, G., Dahmane, T., de la Maza, L. M., Ebel, C., Gabel, F., Giusti, F., Gohon, Y., Goormaghtigh, E., Guittet, E., Kleinschmidt, J. H., Kuhlbrandt, W., Le Bon, C., Martinez, K. L., Picard, M., Pucci, B., Sachs, J. N., Tribet, C., van Heijenoort, C., Wien, F., Zito, F. and Zoonens, M. (2011) Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys, 40*, pp. 379-408.

Prandi, S., Voigt, A., Meyerhof, W. and Behrens, M. (2018) Expression profiling of Tas2r genes reveals a complex pattern along the mouse GI tract and the presence of Tas2r131 in a subset of intestinal Paneth cells. *75*(1), pp. 49-65.

Prasher, D., McCann, R. O. and Cormier, M. J. (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun, 126*(3), pp. 1259-68.

Pronin, A. N., Xu, H., Tang, H., Zhang, L., Li, Q. and Li, X. (2007) Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol, 17*(16), pp. 1403-8.

Pydi, S. P., Jaggupilli, A., Nelson, K. M., Abrams, S. R., Bhullar, R. P., Loewen, M. C. and Chelikani, P. (2015) Abscisic Acid Acts as a Blocker of the Bitter Taste G Protein-Coupled Receptor T2R4. *Biochemistry, 54*(16), pp. 2622-31.

Pydi, S. P., Sobotkiewicz, T., Billakanti, R., Bhullar, R. P., Loewen, M. C. and Chelikani, P. (2014) Amino acid derivatives as bitter taste receptor (T2R) blockers. *J Biol Chem, 289*(36), pp. 25054-66.

Pydi, S. P., Upadhyaya, J., Singh, N., Pal Bhullar, R. and Chelikani, P. (2012) Recent advances in structure and function studies on human bitter taste receptors. *Curr Protein Pept Sci, 13*(6), pp. 501-8.

Raliou, M., Boucher, Y., Wiencis, A., Bezirard, V., Pernollet, J. C., Trotier, D., Faurion, A. and Montmayeur, J. P. (2009a) Tas1R1-Tas1R3 taste receptor variants in human fungiform papillae. *Neurosci Lett, 451*(3), pp. 217-21.

Raliou, M., Grauso, M., Hoffmann, B., Schlegel-Le-Poupon, C., Nespoulous, C., Debat, H., Belloir, C., Wiencis, A., Sigoillot, M., Bano, S. P., Trotier, D., Pernollet, J. C., Montmayeur, J. P., Faurion, A. and Briand, L. (2011) Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. *Chem Senses, 36*(6), pp. 527-37.

Raliou, M., Wiencis, A., Pillias, A. M., Planchais, A., Eloit, C., Boucher, Y., Trotier, D., Montmayeur, J. P. and Faurion, A. (2009b) Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human tas1r1, tas1r3, and mGluR1 and individual taste sensitivity to glutamate. *Am J Clin Nutr, 90*(3), pp. 789s-799s.

Randall, R. P., Schurg, W. A. and Church, D. C. (1978) Response of horses to sweet, salty, sour and bitter solutions. *J Anim Sci, 47*(1), pp. 51-5.

Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K. and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature, 477*(7366), pp. 549-55.

Ray, K., Clapp, P., Goldsmith, P. K. and Spiegel, A. M. (1998) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem, 273*(51), pp. 34558-67.

Reckel, S., Sobhanifar, S., Durst, F., Lohr, F., Shirokov, V. A., Dotsch, V. and Bernhard, F. (2010) Strategies for the cell-free expression of membrane proteins. *Methods Mol Biol, 607*, pp. 187-212.

Reed, D. R. (2008) Animal models of gene-nutrient interactions. *Obesity (Silver Spring), 16 Suppl 3*, pp. S23-7.

Reed, D. R., Li, S., Li, X., Huang, L., Tordoff, M. G., Starling-Roney, R., Taniguchi, K., West, D. B., Ohmen, J. D., Beauchamp, G. K. and Bachmanov, A. A. (2004) Polymorphisms in the taste receptor gene (Tas1r3) region are associated with saccharin preference in 30 mouse strains. *J Neurosci, 24*(4), pp. 938-46.

Reeds, P. J., Burrin, D. G., Stoll, B. and Jahoor, F. (2000) Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr, 130*(4S Suppl), pp. 978s-82s.

Reeves, P. J., Callewaert, N., Contreras, R. and Khorana, H. G. (2002a) Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(21), pp. 13419-24.

Reeves, P. J., Kim, J. M. and Khorana, H. G. (2002b) Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(21), pp. 13413-8.

Reiter, S., Campillo Rodriguez, C. and Sun, K. (2015) Spatiotemporal Coding of Individual Chemicals by the Gustatory System. *35*(35), pp. 12309-21.

Roland, W. S., Gouka, R. J., Gruppen, H., Driesse, M., van Buren, L., Smit, G. and Vincken, J. P. (2014) 6-methoxyflavanones as bitter taste receptor blockers for hTAS2R39. *PLoS One, 9*(4), pp. e94451.

Rolls, E. T. (1997) Taste and olfactory processing in the brain and its relation to the control of eating. *Crit Rev Neurobiol, 11*(4), pp. 263-87.

Rondard, P., Liu, J., Huang, S., Malhaire, F., Vol, C., Pinault, A., Labesse, G. and Pin, J. P. (2006) Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J Biol Chem, 281*(34), pp. 24653-61.

Rondard, P. and Pin, J. P. (2015) Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Pharmacol, 20*, pp. 95-101.

Roper, S. D. (1992) The microphysiology of peripheral taste organs. *J Neurosci, 12*(4), pp. 1127-34.

Roper, S. D. (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch, 454*(5), pp. 759-76.

Roper, S. D. (2013) Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Semin Cell Dev Biol, 24*(1), pp. 71-9.

Roper, S. D. (2015) The taste of table salt. *Pflugers Arch, 467*(3), pp. 457-63.

Roper, S. D. and Chaudhari, N. (2017) Taste buds: cells, signals and synapses. *Nat Rev Neurosci, 18*(8), pp. 485-497.

Rosen, M. J. and Kunjappu, J. T. (2012) *Surfactants and Interfacial Phenomena,* 4th Edition, John Wiley & Sons Ltd., New York. ed., Wiley.

Rotzoll, N., Dunkel, A. and Hofmann, T. (2006) Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (Morchella deliciosa Fr.). *J Agric Food Chem, 54*(7), pp. 2705-11.

Roudnitzky, N., Bufe, B., Thalmann, S., Kuhn, C., Gunn, H. C., Xing, C., Crider, B. P., Behrens, M., Meyerhof, W. and Wooding, S. P. (2011) Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners. *Hum Mol Genet, 20*(17), pp. 3437-49.

Roudot-Algaron, F. (1996) The taste of amino acids, peptides and proteins: examples of tasty peptides in casein hydrolysates. *Lait, 76*(4), pp. 313-348.

Routledge, S. J., Mikaliunaite, L., Patel, A., Clare, M., Cartwright, S. P., Bawa, Z., Wilks, M. D., Low, F., Hardy, D., Rothnie, A. J. and Bill, R. M. (2016) The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Methods, 95*, pp. 26-37.

Rozengurt, E. (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 291*(2), pp. G171-7.

Rues, R. B., Orban, E., Dotsch, V. and Bernhard, F. (2014) Cell-free expression of G-protein coupled receptors: new pipelines for challenging targets. *Biol Chem, 395*(12), pp. 1425-34.

Running, C. A., Craig, B. A. and Mattes, R. D. (2015) Oleogustus: The Unique Taste of Fat. *Chem Senses, 40*(7), pp. 507-16.

Saarenpaa, T., Jaakola, V. P. and Goldman, A. (2015) Baculovirus-mediated expression of GPCRs in insect cells. *Methods Enzymol, 556*, pp. 185-218.

Sadaf, A., Ramos, M., Mortensen, J. S., Du, Y., Bae, H. E., Munk, C. F., Hariharan, P., Byrne, B., Kobilka, B. K., Loland, C. J. and Guan, L. (2019) Conformationally Restricted Monosaccharide-Cored Glycoside Amphiphiles: The Effect of Detergent Headgroup Variation on Membrane Protein Stability.

Sainz, E., Cavenagh, M. M., Gutierrez, J., Battey, J. F., Northup, J. K. and Sullivan, S. L. (2007) Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem J, 403*(3), pp. 537-43.

Saito, H., Kubota, M., Roberts, R. W., Chi, Q. and Matsunami, H. (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell, 119*(5), pp. 679-91.
Sakurai, T., Misaka, T., Ishiguro, M., Masuda, K., Sugawara, T., Ito, K., Kobayashi, T., Matsuo, S., Ishimaru, Y., Asakura, T. and Abe, K. (2010) Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J Biol Chem, 285*(36), pp. 28373-8.
Salles, C., Kerjean, J. R., Veiseth-Kent, E., Stieger, M., Wilde, P., Cotillon, C. and consortium, t. T. (2017) The TeRiFiQ project: Combining technologies to achieve significant binary reductions in sodium, fat and sugar content in everyday foods whilst optimising their nutritional quality. *Nutrition Bulletin, 42*(4), pp. 361-368.
San Gabriel, A., Uneyama, H., Maekawa, T. and Torii, K. (2009) The calcium-sensing receptor in taste tissue. *Biochem Biophys Res Commun, 378*(3), pp. 414-8.
Sandal, M., Behrens, M., Brockhoff, A., Musiani, F., Giorgetti, A., Carloni, P. and Meyerhof, W. (2015) Evidence for a Transient Additional Ligand Binding Site in the TAS2R46 Bitter Taste Receptor. *J Chem Theory Comput, 11*(9), pp. 4439-49.
Saotome, K. and Teng, B. (2019) Structures of the otopetrin proton channels Otop1 and Otop3. *26*(6), pp. 518-525.
Sarramegna, V., Muller, I., Milon, A. and Talmont, F. (2006) Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cell Mol Life Sci*.
Sato, T., Shimada, Y., Nagasawa, N., Nakanishi, S. and Jingami, H. (2003) Amino acid mutagenesis of the ligand binding site and the dimer interface of the metabotropic glutamate receptor 1. Identification of crucial residues for setting the activated state. *J Biol Chem, 278*(6), pp. 4314-21.
Schiffman, S. S., Booth, B. J., Losee, M. L., Pecore, S. D. and Warwick, Z. S. (1995) Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res Bull, 36*(5), pp. 505-13.
Schiffman, S. S., Lockhead, E. and Maes, F. W. (1983) Amiloride reduces the taste intensity of Na+ and Li+ salts and sweeteners. *Proc Natl Acad Sci U S A, 80*(19), pp. 6136-40.
Schiffman, S. S., Sennewald, K. and Gagnon, J. (1981) Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L-amino acids. *Physiol Behav, 27*(1), pp. 51-9.
Schindler, A., Dunkel, A., Stahler, F., Backes, M., Ley, J., Meyerhof, W. and Hofmann, T. (2011) Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach. *J Agric Food Chem, 59*(23), pp. 12578-88.
Schlichtherle-Cerny, H. and Grosch, W. (1998) Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A, 207*(5), pp. 369-376.
Schmidt, T. G. and Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A, 676*(2), pp. 337-45.
Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dotsch, V. and Bernhard, F. (2010) Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol Biol, 601*, pp. 165-86.
Schobel, N., Radtke, D., Kyereme, J., Wollmann, N., Cichy, A., Obst, K., Kallweit, K., Kletke, O., Minovi, A., Dazert, S., Wetzel, C. H., Vogt-Eisele, A., Gisselmann, G., Ley, J. P., Bartoshuk, L. M., Spehr, J., Hofmann, T. and Hatt, H. (2014) Astringency is a trigeminal sensation that involves the activation of G protein-coupled signaling by phenolic compounds. *Chem Senses, 39*(6), pp. 471-87.
Sclafani, A., Marambaud, P. and Ackroff, K. (2014) Sucrose-conditioned flavor preferences in sweet ageusic T1r3 and Calhm1 knockout mice. *Physiol Behav, 126*, pp. 25-9.
Sclafani, A., Zukerman, S., Glendinning, J. I. and Margolskee, R. F. (2007) Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 293*(4), pp. R1504-13.
Seddon, A. M., Curnow, P. and Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta, 1666*(1-2), pp. 105-17.
Segers, K. and Masure, S. (2015) Cell-Free Expression of G Protein-Coupled Receptors. *Curr Protoc Protein Sci, 81*, pp. 29.14.1-29.
Servant, G., Tachdjian, C., Tang, X. Q., Werner, S., Zhang, F., Li, X., Kamdar, P., Petrovic, G., Ditschun, T., Java, A., Brust, P., Brune, N., DuBois, G. E., Zoller, M. and Karanewsky, D. S. (2010) Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4746-51.
Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. and Graham, F. L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb j, 16*(8), pp. 869-71.
Shi, P. and Zhang, J. (2006) Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol Biol Evol, 23*(2), pp. 292-300.
Shigemura, N., Ohkuri, T., Sadamitsu, C., Yasumatsu, K., Yoshida, R., Beauchamp, G. K., Bachmanov, A. A. and Ninomiya, Y. (2008) Amiloride-sensitive NaCl taste responses are associated with genetic variation of ENaC alpha-subunit in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 294*(1), pp. R66-75.
Shigemura, N., Shirosaki, S., Ohkuri, T., Sanematsu, K., Islam, A. A., Ogiwara, Y., Kawai, M., Yoshida, R. and Ninomiya, Y. (2009a) Variation in umami perception and in candidate genes for the umami receptor in mice and humans. *Am J Clin Nutr, 90*(3), pp. 764s-769s.
Shigemura, N., Shirosaki, S., Sanematsu, K., Yoshida, R. and Ninomiya, Y. (2009b) Genetic and molecular basis of individual differences in human umami taste perception. *PLoS One, 4*(8), pp. e6717.
Shilling, P. J., Bumbak, F., Scott, D. J. and Bathgate, R. A. D. (2017) Characterisation of a cell-free synthesised G-protein coupled receptor. *7*(1), pp. 1094.
Sigoillot, M., Brockhoff, A., Meyerhof, W. and Briand, L. (2012) Sweet-taste-suppressing compounds: current knowledge and perspectives of application. *Appl Microbiol Biotechnol, 96*(3), pp. 619-30.
Sigoillot, M., Brockhoff, A., Neiers, F., Poirier, N., Belloir, C., Legrand, P., Charron, C., Roblin, P., Meyerhof, W. and Briand, L. (2018) The Crystal Structure of Gurmarin, a Sweet Taste-Suppressing Protein: Identification of the Amino Acid Residues Essential for Inhibition. *Chem Senses, 43*(8), pp. 635-643.
Sigoillot, M., Laffitte, A., Neiers, F. and Briand, L. (2015) Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques. *Cahiers de Nutrition et de Diététique, 50*(5), pp. 252-261.

Silve, C., Petrel, C., Leroy, C., Bruel, H., Mallet, E., Rognan, D. and Ruat, M. (2005) Delineating a Ca2+ binding pocket within the venus flytrap module of the human calcium-sensing receptor. *J Biol Chem, 280*(45), pp. 37917-23.

Simons, P. J., Kummer, J. A., Luiken, J. J. and Boon, L. (2011) Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem, 113*(8), pp. 839-43.

Singarapu, K. K., Tonelli, M., Markley, J. L. and Assadi-Porter, F. M. (2016) Structure-function relationships of brazzein variants with altered interactions with the human sweet taste receptor. *Protein Sci, 25*(3), pp. 711-9.

Singh, N., Chakraborty, R., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2014) Differential expression of bitter taste receptors in non-cancerous breast epithelial and breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun, 446*(2), pp. 499-503.

Singh, N., Vrontakis, M., Parkinson, F. and Chelikani, P. (2011) Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochem Biophys Res Commun, 406*(1), pp. 146-51.

Singla, R. and Jaitak, V. (2016) Synthesis of rebaudioside A from stevioside and their interaction model with hTAS2R4 bitter taste receptor. *Phytochemistry, 125*, pp. 106-11.

Skrzypek, R., Iqbal, S. and Callaghan, R. (2018) Methods of reconstitution to investigate membrane protein function. *Methods, 147*, pp. 126-141.

Slack, J. P., Brockhoff, A., Batram, C., Menzel, S., Sonnabend, C., Born, S., Galindo, M. M., Kohl, S., Thalmann, S., Ostopovici-Halip, L., Simons, C. T., Ungureanu, I., Duineveld, K., Bologa, C. G., Behrens, M., Furrer, S., Oprea, T. I. and Meyerhof, W. (2010) Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol, 20*(12), pp. 1104-9.

Slotboom, D. J., Duurkens, R. H., Olieman, K. and Erkens, G. B. (2008) Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods, 46*(2), pp. 73-82.

Smrcka, A. V. (2008) G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci, 65*(14), pp. 2191-214.

Sonnabend, A., Spahn, V., Stech, M., Zemella, A., Stein, C. and Kubick, S. (2017) Production of G protein-coupled receptors in an insect-based cell-free system. *114*(10), pp. 2328-2338.

Spielman, A. I. (1998) Gustducin and its role in taste. *J Dent Res, 77*(4), pp. 539-44.

Stanska, K. and Krzeski, A. (2016) The umami taste: from discovery to clinical use. *Otolaryngol Pol, 70*(4), pp. 10-5.

Starkenmann, C., Cayeux, I. and Birkbeck, A. A. (2011) Exploring natural products for new taste sensations. *Chimia (Aarau), 65*(6), pp. 407-10.

Steinert, R. E., Gerspach, A. C., Gutmann, H., Asarian, L., Drewe, J. and Beglinger, C. (2011) The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clin Nutr, 30*(4), pp. 524-32.

Stepanenko, A. A. and Dmitrenko, V. V. (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene, 569*(2), pp. 182-90.

Stroud, Z., Hall, S. C. L. and Dafforn, T. R. (2018) Purification of membrane proteins free from conventional detergents: SMA, new polymers, new opportunities and new insights. *Methods, 147*, pp. 106-117.

Suess, B., Brockhoff, A., Degenhardt, A., Billmayer, S., Meyerhof, W. and Hofmann, T. (2014) Human taste and umami receptor responses to chemosensorica generated by Maillard-type N(2)-alkyl- and N(2)-arylthiomethylation of guanosine 5'-monophosphates. *J Agric Food Chem, 62*(47), pp. 11429-40.

Suess, B., Brockhoff, A., Meyerhof, W. and Hofmann, T. (2018) The Odorant (R)-Citronellal Attenuates Caffeine Bitterness by Inhibiting the Bitter Receptors TAS2R43 and TAS2R46. *J Agric Food Chem, 66*(10), pp. 2301-2311.

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E. and Elinav, E. (2014) Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature, 514*(7521), pp. 181-6.

Sugawara, T., Ito, K., Shiroishi, M., Tokuda, N., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Misaka, T., Nomura, N., Murata, T., Abe, K., Iwata, S. and Kobayashi, T. (2009) Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in Saccharomyces cerevisiae. *Biochem Biophys Res Commun, 382*(4), pp. 704-10.

Suku, E., Fierro, F., Giorgetti, A., Alfonso-Prieto, M. and Carloni, P. (2017) Multi-scale simulations of membrane proteins: The case of bitter taste receptors. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices, 2*(1), pp. 15-21.

Sun-Waterhouse, D. and Wadhwa, S. S. (2013) Industry-Relevant Approaches for Minimising the Bitterness of Bioactive Compounds in Functional Foods: A Review. *Food and bioprocess technology, 6*(3), pp. 607-627.

Tabata, S., Nampo, M., Mihara, E., Tamura-Kawakami, K., Fujii, I. and Takagi, J. (2010) A rapid screening method for cell lines producing singly-tagged recombinant proteins using the "TARGET tag" system. *J Proteomics, 73*(9), pp. 1777-85.

Takai, S., Yasumatsu, K., Inoue, M., Iwata, S., Yoshida, R., Shigemura, N., Yanagawa, Y., Drucker, D. J., Margolskee, R. F. and Ninomiya, Y. (2015) Glucagon-like peptide-1 is specifically involved in sweet taste transmission. *Faseb j, 29*(6), pp. 2268-80.

Tan, J., Abrol, R., Trzaskowski, B. and Goddard, W. A., 3rd (2012) 3D structure prediction of TAS2R38 bitter receptors bound to agonists phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP). *J Chem Inf Model, 52*(7), pp. 1875-85.

Tan, V. W. K., Wee, M. S. M., Tomic, O. and Forde, C. G. (2019) Temporal sweetness and side tastes profiles of 16 sweeteners using temporal check-all-that-apply (TCATA). *Food Research International, 121*, pp. 39-47.

Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., Koppel, J., Davies, P., Civan, M. M., Chaudhari, N., Matsumoto, I., Hellekant, G., Tordoff, M. G., Marambaud, P. and Foskett, J. K. (2013) CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature, 495*(7440), pp. 223-6.

Teng, B., Wilson, C. E., Tu, Y. H., Joshi, N. R., Kinnamon, S. C. and Liman, E. R. (2019) Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1. *Curr Biol*.
Thal, D. M., Vuckovic, Z., Draper-Joyce, C. J., Liang, Y. L., Glukhova, A., Christopoulos, A. and Sexton, P. M. (2018) Recent advances in the determination of G protein-coupled receptor structures. *Curr Opin Struct Biol, 51*, pp. 28-34.
Thomas-Danguin, T. and Guichard, E. (2019) Cross-modal interactions as a strategy to enhance salty taste and to maintain liking of low-salt food: a review. *10*(9), pp. 5269-5281.
Thomas, P. and Smart, T. G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods, 51*(3), pp. 187-200.
Thompson, R. F., Walker, M., Siebert, C. A., Muench, S. P. and Ranson, N. A. (2016) An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods, 100*, pp. 3-15.
Thomsen, W., Frazer, J. and Unett, D. (2005) Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol, 16*(6), pp. 655-65.
Thonghin, N., Kargas, V., Clews, J. and Ford, R. C. (2018) Cryo-electron microscopy of membrane proteins. *Methods, 147*, pp. 176-186.
Tizzano, M., Dvoryanchikov, G., Barrows, J. K., Kim, S., Chaudhari, N. and Finger, T. E. (2008) Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci, 9*, pp. 110.
Toda, Y., Nakagita, T., Hayakawa, T., Okada, S., Narukawa, M., Imai, H., Ishimaru, Y. and Misaka, T. (2013) Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor). *J Biol Chem, 288*(52), pp. 36863-77.
Toda, Y., Nakagita, T., Hirokawa, T., Yamashita, Y., Nakajima, A., Narukawa, M., Ishimaru, Y., Uchida, R. and Misaka, T. (2018) Positive/Negative Allosteric Modulation Switching in an Umami Taste Receptor (T1R1/T1R3) by a Natural Flavor Compound, Methional. *8*(1), pp. 11796.
Toda, Y., Okada, S. and Misaka, T. (2011) Establishment of a new cell-based assay to measure the activity of sweeteners in fluorescent food extracts. *J Agric Food Chem, 59*(22), pp. 12131-8.
Tome, D. (2018) The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine. *Ann Nutr Metab, 73 Suppl 5*, pp. 15-20.
Tordoff, M. G., Alarcon, L. K., Valmeki, S. and Jiang, P. (2012) T1R3: a human calcium taste receptor. *Sci Rep, 2*, pp. 496.
Tordoff, M. G., Aleman, T. R., Ellis, H. T., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Shestopalov, V. I., Mitchell, C. H., Foskett, J. K. and Poole, R. L. (2015) Normal Taste Acceptance and Preference of PANX1 Knockout Mice. *Chem Senses, 40*(7), pp. 453-9.
Travers, S. P. and Norgren, R. (1995) Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. *J Neurophysiol, 73*(6), pp. 2144-62.
Tribet, C., Audebert, R. and Popot, J. L. (1996) Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(26), pp. 15047-50.
Trinquet, E., Bouhelal, R. and Dietz, M. (2011) Monitoring Gq-coupled receptor response through inositol phosphate quantification with the IP-One assay. *Expert Opin Drug Discov, 6*(10), pp. 981-94.
Trubey, K. R., Culpepper, S., Maruyama, Y., Kinnamon, S. C. and Chaudhari, N. (2006) Tastants evoke cAMP signal in taste buds that is independent of calcium signaling. *Am J Physiol Cell Physiol, 291*(2), pp. C237-44.
Tseng, Y.-H., Lee, Y.-L., Li, R.-C. and Mau, J.-L. (2005) Non-volatile flavour components of Ganoderma tsugae. *Food Chemistry, 90*(3), pp. 409-415.
Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H. and Morikawa, K. (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+}. *Proc Natl Acad Sci U S A, 99*(5), pp. 2660-5.
Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. and Arakawa, T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif, 28*(1), pp. 1-8.
Tu, Y. H. and Cooper, A. J. (2018) An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *359*(6379), pp. 1047-1050.
Ueda, T., Ugawa, S., Ishida, Y., Shibata, Y., Murakami, S. and Shimada, S. (2001) Identification of coding single-nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting. *Biochem Biophys Res Commun, 285*(1), pp. 147-51.
Ueda, T., Ugawa, S. and Shimada, S. (2005) Functional interaction between TAS2R receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *Chem Senses, 30 Suppl 1*, pp. i16.
Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R. and Kimizuka, A. (1990) Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agricultural and Biological Chemistry, 54*(1), pp. 163-169.
Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M. and Miyajima, R. (1997) Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Biosci Biotechnol Biochem, 61*(12), pp. 1977-80.
Upadhyaya, J., Singh, N., Bhullar, R. P. and Chelikani, P. (2015) The structure-function role of C-terminus in human bitter taste receptor T2R4 signaling. *Biochim Biophys Acta, 1848*(7), pp. 1502-8.
van der Klaauw, N. J. and Smith, D. V. (1995) Taste quality profiles for fifteen organic and inorganic salts. *Physiol Behav, 58*(2), pp. 295-306.
Vandenbeuch, A., Anderson, C. B. and Kinnamon, S. C. (2015) Mice Lacking Pannexin 1 Release ATP and Respond Normally to All Taste Qualities. *Chem Senses, 40*(7), pp. 461-7.
Vandenbeuch, A., Clapp, T. R. and Kinnamon, S. C. (2008) Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci, 9*, pp. 1.
Vassylyeva, M. N., Klyuyev, S., Vassylyev, A. D., Wesson, H., Zhang, Z., Renfrow, M. B., Wang, H., Higgins, N. P., Chow, L. T. and Vassylyev, D. G. (2017) Efficient, ultra-high-affinity chromatography in a one-step purification of complex proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A, 114*(26), pp. E5138-e5147.
Velisek, J., Davidek, J., Hajslova, J., Kubelka, V., Janicek, G. and Mankova, B. (1978) Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Z Lebensm Unters Forsch, 167*(4), pp. 241-4.
Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F. and Babu, M. M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature, 494*(7436), pp. 185-94.

Venkatakrishnan, A. J., Ma, A. K., Fonseca, R., Latorraca, N. R., Kelly, B., Betz, R. M., Asawa, C., Kobilka, B. K. and Dror, R. O. (2019) Diverse GPCRs exhibit conserved water networks for stabilization and activation. *116*(8), pp. 3288-3293.
Vestergaard, B. (2016) Analysis of biostructural changes, dynamics, and interactions - Small-angle X-ray scattering to the rescue. *Arch Biochem Biophys, 602*, pp. 69-79.
Vinothkumar, K. R. (2015) Membrane protein structures without crystals, by single particle electron cryomicroscopy. *Curr Opin Struct Biol, 33*, pp. 103-14.
von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E. and Locksley, R. M. (2016) Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature, 529*(7585), pp. 221-5.
Wang, J., Liu, Y., Zhang, J., Han, Z., Wang, W., Liu, Y., Wei, D. and Huang, W. (2017) Cell-Free Expression, Purification, and Characterization of the Functional beta2-Adrenergic Receptor for Multianalyte Detection of beta-Agonists. *Biochemistry (Mosc), 82*(11), pp. 1346-1353.
Weis, W. I. and Kobilka, B. K. (2018) The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem, 87*, pp. 897-919.
Wheatley, M., Charlton, J., Jamshad, M., Routledge, S. J., Bailey, S., La-Borde, P. J., Azam, M. T., Logan, R. T., Bill, R. M., Dafforn, T. R. and Poyner, D. R. (2016) GPCR-styrene maleic acid lipid particles (GPCR-SMALPs): their nature and potential. *Biochem Soc Trans, 44*(2), pp. 619-23.
Wingfield, P. T. (2015) Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr Protoc Protein Sci, 80*, pp. 6.1.1-35.
Winkel, C., de Klerk, A., Visser, J., de Rijke, E., Bakker, J., Koenig, T. and Renes, H. (2008) New developments in umami (enhancing) molecules. *Chem Biodivers, 5*(6), pp. 1195-203.
Winnig, M., Bufe, B., Kratochwil, N. A., Slack, J. P. and Meyerhof, W. (2007) The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol, 7*, pp. 66.
Winnig, M., Bufe, B. and Meyerhof, W. (2005) Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neurosci, 6*, pp. 22.
Witt, M., Reutter, K., Miller Jr, I. and Doty, R. (2003) Morphology of the peripheral taste system. *Handbook of olfaction and gustation,* (Ed. 2), pp. 651-677.
Wolfle, U., Elsholz, F. A., Kersten, A., Haarhaus, B., Muller, W. E. and Schempp, C. M. (2015a) Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol, 28*(3), pp. 137-46.
Wolfle, U., Haarhaus, B., Kersten, A., Fiebich, B., Hug, M. J. and Schempp, C. M. (2015b) Salicin from Willow Bark can Modulate Neurite Outgrowth in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Phytother Res, 29*(10), pp. 1494-500.
Wolfle, U., Haarhaus, B. and Schempp, C. M. (2015c) Amarogentin Displays Immunomodulatory Effects in Human Mast Cells and Keratinocytes. *Mediators Inflamm, 2015*, pp. 630128.
Wolfle, U., Haarhaus, B., Seiwerth, J., Cawelius, A., Schwabe, K., Quirin, K. W. and Schempp, C. M. (2017) The Herbal Bitter Drug Gentiana lutea Modulates Lipid Synthesis in Human Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci, 18*(8).
Wong, G. T., Gannon, K. S. and Margolskee, R. F. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature, 381*(6585), pp. 796-800.
Wooding, S. P., Atanasova, S., Gunn, H. C., Staneva, R., Dimova, I. and Toncheva, D. (2012) Association of a bitter taste receptor mutation with Balkan Endemic Nephropathy (BEN). *BMC Med Genet, 13*, pp. 96.
Wu, A., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N. and Roper, S. D. (2015) Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nat Commun, 6*, pp. 8171.
Wu, C., Du, L., Zou, L., Huang, L. and Wang, P. (2013) A biomimetic bitter receptor-based biosensor with high efficiency immobilization and purification using self-assembled aptamers. *Analyst, 138*(20), pp. 5989-5994.
Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., Niswender, C. M., Katritch, V., Meiler, J., Cherezov, V., Conn, P. J. and Stevens, R. C. (2014) Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science, 344*(6179), pp. 58-64.
Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol, 22*(11), pp. 1393-8.
Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M. and Li, X. (2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(39), pp. 14258-63.
Yamaguchi, S. (1967) The Synergistic Taste Effect of Monosodium Glutamate and Disodium 5′-Inosinate. *Journal of Food Science, 32*(4), pp. 473-478.
Yamaguchi, S. (1987) Fundamental properties of umami in human taste sensation. *Umami : a basic taste*.
Yamaguchi, S. (1991) Basic properties of umami and effects on humans. *Physiol Behav, 49*(5), pp. 833-41.
Yamaguchi, S. (1998) Basic properties of umami and its effects on food flavor. *Food Reviews International, 14*(2-3), pp. 139-176.
Yamamoto, K. and Ishimaru, Y. (2013) Oral and extra-oral taste perception. *Semin Cell Dev Biol, 24*(3), pp. 240-6.
Yang, R., Crowley, H. H., Rock, M. E. and Kinnamon, J. C. (2000a) Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol, 424*(2), pp. 205-15.
Yang, R., Tabata, S., Crowley, H. H., Margolskee, R. F. and Kinnamon, J. C. (2000b) Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J Comp Neurol, 425*(1), pp. 139-51.
Yano, T., Takeda, H., Uematsu, A., Yamanaka, S., Nomura, S., Nemoto, K., Iwasaki, T., Takahashi, H. and Sawasaki, T. (2016) AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS One, 11*(6), pp. e0156716.
Ye, H. (2006) Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering. *Anal Biochem, 356*(1), pp. 76-85.
Ye, W., Chang, R. B., Bushman, J. D., Tu, Y. H., Mulhall, E. M., Wilson, C. E., Cooper, A. J., Chick, W. S., Hill-Eubanks, D. C., Nelson, M. T., Kinnamon, S. C. and Liman, E. R. (2016) The K+ channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A, 113*(2), pp. E229-38.

Yee, C. L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T. E. and Kinnamon, J. C. (2001) "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol, 440*(1), pp. 97-108.

Yin, Y. and Wu, M. (2018) Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *359*(6372), pp. 237-241.

Yoshida, R., Noguchi, K., Shigemura, N., Jyotaki, M., Takahashi, I., Margolskee, R. F. and Ninomiya, Y. (2015) Leptin Suppresses Mouse Taste Cell Responses to Sweet Compounds. *Diabetes, 64*(11), pp. 3751-62.

Zeeb, B., Yavuz-Duzgun, M., Dreher, J., Evert, J., Stressler, T., Fischer, L., Ozcelik, B. and Weiss, J. (2018) Modulation of the bitterness of pea and potato proteins by a complex coacervation method. *Food Funct, 9*(4), pp. 2261-2269.

Zhang, C., Zhang, T., Zou, J. and Miller, C. L. (2016) Structural basis for regulation of human calcium-sensing receptor by magnesium ions and an unexpected tryptophan derivative co-agonist. *2*(5), pp. e1600241.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Liu, H., Xu, H., Servant, G., Zoller, M., Tachdjian, C. and Li, X. (2010) Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A, 107*(10), pp. 4752-7.

Zhang, F., Klebansky, B., Fine, R. M., Xu, H., Pronin, A., Liu, H., Tachdjian, C. and Li, X. (2008) Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(52), pp. 20930-4.

Zhang, R. and Xie, X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol Sin, 33*(3), pp. 372-84.

Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S. and Ryba, N. J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell, 112*(3), pp. 293-301.

Zhang, Y., Wang, X., Li, X., Peng, S., Wang, S., Huang, C. Z., Huang, C. Z., Zhang, Q., Li, D., Jiang, J., Ouyang, Q., Zhang, Y., Li, S. and Qiao, Y. (2017) Identification of a specific agonist of human TAS2R14 from Radix Bupleuri through virtual screening, functional evaluation and binding studies. *Sci Rep, 7*(1), pp. 12174.

Zhao, C. J., Schieber, A. and Ganzle, M. G. (2016) Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations - A review. *Food Res Int, 89*(Pt 1), pp. 39-47.

Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell, 115*(3), pp. 255-66.

Zhao, H., Yang, J. R., Xu, H. and Zhang, J. (2010) Pseudogenization of the umami taste receptor gene Tas1r1 in the giant panda coincided with its dietary switch to bamboo. *Mol Biol Evol, 27*(12), pp. 2669-73.

Zhao, L., Zhang, Y., Venkitasamy, C., Pan, Z., Zhang, L., Guo, S., Xiong, W., Xia, H., Wenlong, L. and Xinhua, G. (2018) Preparation of umami octopeptide with recombined Escherichia coli: Feasibility and challenges. *Bioengineered, 9*(1), pp. 166-169.

Zhao, Y., Zhang, M., Devahastin, S. and Liu, Y. (2019) Progresses on processing methods of umami substances: A review. *Trends in Food Science & Technology, 93*, pp. 125-135.

Zoonens, M. and Popot, J. L. (2014) Amphipols for each season. *J Membr Biol, 247*(9-10), pp. 759-96.

Annexe

Protein Expression and Purification 129 (2017) 31–43

Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep

Biophysical and functional characterization of the human olfactory receptor OR1A1 expressed in a mammalian inducible cell line

Christine Belloir, Marie-Louise Miller-Leseigneur, Fabrice Neiers, Loïc Briand, Anne-Marie Le Bon*

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 June 2016
Received in revised form
7 September 2016
Accepted 15 September 2016
Available online 15 September 2016

Keywords:
Olfactory receptor
Recombinant expression
Purification
Structure
Ligand binding

ABSTRACT

Olfactory receptors (ORs) play a crucial role in detecting the odorant molecules present in the surrounding environment. These receptors, which belong to class A G-protein-coupled receptors, constitute the largest transmembrane protein family in the human genome. Functional studies showed that the OR family includes members that are able to respond to a large set of odorants and members that are activated by a relatively small number of related odorants. To understand the molecular mechanisms that govern the receptor–ligand interactions, we overexpressed the human OR hOR1A1 in a stable tetracycline-inducible HEK293S cell line. This receptor was engineered by inserting a C-terminal rho1D4 epitope tag and an N-terminal FLAG epitope tag to allow its purification and detection. The functional activity of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 in heterologous HEK293S cells was analysed using a real-time cAMP assay. A two-step purification using monoclonal anti-FLAG immunoaffinity purification and gel filtration was then employed to purify the detergent-solubilized receptor. A size exclusion chromatography-multi-angle light scattering analysis showed the presence of monomeric and dimeric forms of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1. The amounts of the monomeric and dimeric forms purified from sixty T175 flasks were approximately 1.6 and 1.1 mg, respectively. The circular dichroism analysis showed that the purified receptor was properly folded. Ligand binding was quantified using an intrinsic tryptophan fluorescence assay and revealed that the detergent-solubilized FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 bound its cognate odorant, dihydrojasmone, with an affinity in the micromolar range. These results pave the way for future crystallographic and NMR studies.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In vertebrates, the olfactory sensory neurons (OSNs) located in the olfactory epithelium of the nasal cavity are responsible for detecting the odorant molecules present in the surrounding environment. Odorant molecules bind to olfactory receptors (ORs) that are embedded in the cilia of OSNs. This interaction triggers an increase in the intraciliary concentration of cAMP through the activation of the olfactory G protein G_{olf} and type III adenylyl cyclase. The increased cAMP level opens a cyclic nucleotide-gated cation channel, allowing an influx of Na^+ and Ca^+ ions that ultimately contributes to OSN depolarization. This transduction cascade results in action potentials that are conducted along the axons towards the olfactory bulb [1–3]. The peripheral coding of olfactory signals by the ORs has been explored by analysing the responses of dissociated mouse OSNs or ORs expressed in heterologous cell systems to various odorant molecules [4–8]. These studies showed that one OR is able to respond to multiple odorants and that one odorant may be recognized by several ORs. These observations support a combinatorial coding scheme that allows OSNs to discriminate thousands of olfactory stimuli.

The ORs belong to class A G-protein-coupled receptors (GPCRs) and constitute the largest gene family in the human genome [9,10]. From a structural and functional viewpoint, class A is the largest and best studied GPCR family. Over the last three decades, numerous cellular and biochemical studies have provided a general appreciation of GPCR activation patterns [for reviews, see i.e. 11, 12, 13]. It has been demonstrated that several receptors can bind to different ligands that elicit various types of responses, depending on their potency and their efficiency. In some cases, ligands with a

* Corresponding author.
E-mail address: Anne-Marie.Le-Bon@dijon.inra.fr (A.-M. Le Bon).

http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.09.006
1046-5928/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations

CD	circular dichroism
CMC	critical micelle concentration
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FC14	Fos-choline-14
GPCR	G-protein-coupled receptor
HEK	human embryonic kidney
MALS	multi-angle light scattering
NaBu	sodium butyrate
OR	olfactory receptor
OSN	olfactory sensory neuron
PBS	phosphate-buffered saline
SEC	size exclusion chromatography
TRITC	tetramethyl-rhodamine isothiocyanate

very low efficacy have been found to prevent the response to full or partial agonists (neutral antagonists). More recently, important technological advances in GPCR crystallization allowed researchers to determine the three-dimensional atomic structures of several class A GPCRs, such as the rhodopsin, adrenergic and muscarinic receptors [14]. These studies provided a significant contribution to our understanding of the molecular mechanisms of GPCR signalling. However, the crystal structures of the ORs are not yet available. The mechanisms underlying OR activation have been explored using molecular modelling approaches that are often combined with site-directed mutagenesis experiments. These studies led to the identification of specific amino acid residues that are involved in ligand binding or in the conformational changes of the ORs during the signal transduction (inactive/active states) [15–19]. Biophysical and structural characterization studies are required to obtain more insights into the activation processes of ORs, but access to large quantities of proteins is a prerequisite for such investigations.

With the exception of rhodopsin, most GPCRs are expressed in small amounts *in vivo*, making their purification from native tissues very difficult or even impossible. An alternative that has been extensively developed consists of overexpressing recombinant, functional GPCRs in a variety of hosts, such as bacteria (*Escherichia coli*), yeast, insect cells, mammalian cells or cell-free expression systems [14,20]. Mammalian cell expression systems have an advantage over prokaryotic systems in that the recombinant proteins undergo post-translational modifications, thus mimicking endogenous human protein production [21,22]. In addition, these cells promote near-native protein folding and disulphide bond formation. Several cell lines derived from human embryonic kidney (HEK) 293 cells (HEK293) have recently been developed for the overexpression of various mammalian GPCRs, including rhodopsin, β2-adrenergic receptor, neurotensin receptor 1, parathyroid hormone-1 receptor and formyl peptide receptor 3 [23–27].

Significant progress has recently been made in producing a recombinant OR (hOR17-4) using a specific HEK293 cell line that contains the tetracycline inducible system, HEK293S GnTI$^-$ cells [28,29]. The tetracycline inducible system allows the cells to grow to a high density, and then the expression of the receptor is induced by the addition of tetracycline. This inducible expression is particularly useful for over-expressing exogenous proteins that may inhibit the subsequent growth of the cells. The HEK293S GnTI$^-$ cells lack N-acetylglucosaminyltransferase I (GnTI$^-$) and, consequently, are unable to synthesize complex N-glycans, which can disrupt the purification step and biophysical techniques, such as spectroscopy and crystallography. The conditions for the over-expression, solubilization and purification of the OR produced by these cells have been optimized. The fos-choline detergent FC14 was found to be optimal detergent for solubilizing and stabilizing ORs [28–30]. Moreover, it has been demonstrated that sodium butyrate (NaBu), a histone deacetylase inhibitor, enhances the expression of the OR protein in this cell line [29]. These conditions allow to obtain large quantities of the recombinant OR protein that are suitable for structural and functional investigations.

We took advantage of these recent advances to overexpress and purify the detergent-solubilized human OR hOR1A1 from stable tetracycline-inducible HEK293S GnTI$^-$ cells. We selected this OR because several of its ligands have been identified in cellular function tests. This OR was particularly activated by aliphatic and cyclic ketones (notably dihydrojasmone) and aldehydes [5,15]. Combinatorial approaches involving homology modelling, site-directed mutagenesis studies and computational analyses have been performed to identify the key residues in the binding pocket of this receptor that are involved in ligand binding [15,31]. However, additional studies are needed to obtain more information on the structure of this receptor and to determine the binding constants that govern the receptor–ligand interactions.

As a step towards this objective, two-step purification using monoclonal anti-FLAG immunoaffinity purification and gel filtration was employed to purify the receptor. The purified, detergent-solubilized receptor was structurally and functionally characterized using several methods, including size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS), circular dichroism and intrinsic tryptophan fluorescence.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The odorant molecules (dihydrojasmone, CAS # 1128-08-1; (±)-citronellal, CAS # 106-23-0, citral, CAS # 5392-40-5; (−)-carvone, CAS # 6485-40-1, 3-octanone, CAS # 106-68-3), EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody and FLAG® peptide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The odorant stock solutions (100 mM) were prepared in dimethylsulfoxide and stored at −20 °C. The detergent was purchased from Anatrace (Affymetrix, High Wycombe, United Kingdom). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and all tissue culture media components were purchased from Life Technologies (St Aubin, France), unless indicated otherwise. The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse secondary antibody was obtained from Bio-Rad (Life Science, Marnes-la-Coquette, France). The anti-rho1D4 antibody was obtained from Merck-Millipore (Molsheim, France).

2.2. hOR1A1 gene design and construction

The 309 amino acid sequence of human OR1A1 (hOR1A1) was obtained from the online NCBI Protein database (NCBI accession # NP_055380.2). To facilitate expression of the protein and its purification from mammalian cells, the following modifications were made: 1) codon optimization using the GeneOptimizer™ software (GeneArt, Life Technologies); 2) the addition of a Kozak sequence (GCCACCATGG) immediately before the start codon; 3) the addition of the FLAG epitope tag (DYKDDDDK) to the N-terminus of the hOR1A1 gene after the start codon; 4) the addition of the bovine rhodopsin C9 (rho1D4) epitope tag (TETSQVAPA) to the C-terminus of the protein; and 5) the addition of the *Eco*RI and NotI restriction sites at the 5′ and 3′ ends, respectively to enable subcloning into the

expression vector. Two glycine linkers (GG) were inserted after the FLAG epitope and before the rho1D4 epitope, respectively. The hOR1A1 gene (Fig. S1) was synthesized and subcloned into the pcDNA4/To inducible expression vector from GeneArt (Life Technologies) to produce the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 vector. The plasmid was amplified in *E. coli* DH5α cells (Life Technologies) and purified with a QIAfilter Plasmid Midi kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

2.3. Construction of the stable hOR1A1-inducible HEK293S GnTI⁻ cell lines

The human inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S cell line (HEK293S GnTI⁻) developed by Dr. H.G. Khorana and colleagues [23] was kindly provided by Dr. P.J. Reeves (University of Essex, U.K.). The HEK293S GnTI⁻ cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% foetal bovine serum, non-essential amino acids (0.1 mM), 2 mM GlutaMAX (Gibco, Life Technologies), HEPES (15 mM), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μg/mL) and blasticidin (5 μg/mL). The cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 6.7% CO_2. The stable hOR1A1-HEK293S GnTI⁻ cell line was constructed using the Invitrogen T-Rex tetracycline regulation system, as previously described [28,32]. The pcDNA4/To-Flag-hOR1A1-rho1D4 plasmid was transfected into cells using Fugene HD (Promega, Charbonnieres Les Bains, France). After 48 h, the cells were subjected to antibiotic selection for 2–3 weeks using media supplemented with 5 μg/mL blasticidin and 250 μg/mL zeocin. The surviving cell colonies were then selected and subcloned using cloning rings. Twenty-four clones were expanded step-wise in 24-, 12-, and 6-well plates and screened for the inducible expression of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 using media supplemented with 1 μg/mL tetracycline or media supplemented with 1 μg/mL tetracycline and 5 mM NaBu for 48 h.

2.4. Clonal selection

For the initial screen, the cells were scrape harvested and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% w/v FC14 and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich). After rotating for 4 h, the non-solubilized fraction was pelleted and the solubilized lysate was separated on an SDS-PAGE gel. The expression level of FLAG-Rho1D4-tagged hOR1A1 was estimated by western blotting using the anti-rho1D4 primary antibody (dilution 1/500), as described below. The clone showing the highest level of hOR1A1 expression under the induction conditions, while maintaining undetectable expression without induction, was selected and expanded into large-scale culture for use in all subsequent experiments.

2.5. Immunoblotting analysis of hOR1A1

Before the western blot, the protein concentrations of the samples were determined by the Lowry method [33] using the DC protein assay (Bio-Rad, Life Science, Marnes-la-Coquette, France). The samples (10 or 25 μg/well) were loaded onto 10% SDS-PAGE gels. The molecular weight markers (Precision Plus Protein Western C Standards, Bio-Rad) were loaded in the first lane of each gel. SDS-PAGE was performed using a Mini-Protean® II system (Bio-Rad). Following electrophoresis at 200 V for 40 min, the proteins were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad) at 100 V for 45 min. The membranes were blocked in a solution containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and 5% non-fat dry milk (TBS-T) for 1 h at room temperature. The blots were then incubated with the mouse anti-rho1D4 primary antibody or with the mouse anti-FLAG M2 primary antibody, both diluted at 1/500 in TBS-T, for 1 h at 4 °C. After washing (five 5-min washes with TBS-T), the membranes were incubated with goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (diluted 1:50000) for 1 h at room temperature, and then rinsed five times in TBS-T. The protein-antibody complexes were detected using an ECL chemiluminescence kit (Immun-Star HRP chemiluminescence kit, Bio-Rad) and the ChemiDoc™ XRS Imaging System (Bio-Rad).

2.6. Immunocytochemistry

For the immunocytochemical staining analyses, the stable hOR1A1-HEK293S GnTI⁻ clones were seeded on 4-well culture slides (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) precoated with BD Cell-Tak adhesive (BD Biosciences). When the cells reached ~90% confluence, they were treated with 1 μg/mL of tetracycline and various concentrations of NaBu (0.1–5 mM) for 48 h. Then, the cells were rinsed twice with Hank's HEPES-balanced salt solution and permeabilized for 5 min in cold acetone–methanol (1:1). To visualize the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 expression level, the cells were blocked with 5% donkey serum in PBS for 30 min at 25 °C and incubated for 1 h at 25 °C with a 1/500 dilution of the mouse anti-FLAG M2 primary antibody in an antibody diluent (Dako, Les Ulis, France). The cells were then rinsed twice with PBS for 5 min and incubated with a 1/400 dilution of the AlexaFluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG secondary antibody (Life Technologies) in the Dako antibody diluent for 1 h at 25 °C to visualize the receptor. The cells were analysed using an epi-fluorescence inverted microscope (Eclipse TiE, Nikon, Champigny sur Marne, France) equipped with an ×20 objective lens and a LucaR EMCCD camera (Andor Technology, Belfast, UK).

To study the subcellular localization of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1, the receptor was analysed as previously described. In addition, to visualize the plasma membrane, the cells were cooled on ice for 30 min then incubated with 2 μg/mL biotin–concanavalin A for 1 h on ice before permeabilization. The plasma membrane was then labelled with avidin D-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC) (dilution 1/200; Vector Laboratories, AbCys, France). After washing the cells with PBS, the nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-HCl, which was present in the mounting medium (ProLong Gold antifade reagent, Molecular Probes, Life Technologies). The cells were analysed using a two-photon confocal microscope (Nikon A1-MP) equipped with an ×60 objective lens (DImaCell platform, University of Burgundy, Dijon, France).

2.7. GloSensor cAMP assay

The GloSensor cAMP assay (Promega) is a sensitive real-time luminescent method for measuring GPCR activation by detecting the levels of the intracellular second messenger cAMP [34]. This functional assay was performed in the hOR1A1-inducible HEK293S GnTI⁻ cell line and in Hana3A cells that had been transiently transfected with either the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 plasmid or the pCI-hOR1A1 plasmid. The Hana3A cells and the pCI-hOR1A1 plasmid were kindly provided by Dr. H. Matsunami (Duke University, Durham, USA). The Hana3A cells are HEK293T cells that stably express the OR accessory factors RTP1L, RTP2, Reep1 and the G alpha protein G_{olf} [35]. They were grown in Minimal Essential Medium (MEM) containing 2 mM GlutaMAX, 10% foetal bovine serum (Gibco, Life Technologies), 100 μM Eagle's non-essential amino acids and puromycin (1 μg/mL) at 37 °C. The Hana3A cells were cultivated in a humidified atmosphere containing 7.3% CO_2. Forty-eight hours before the assay, the cells were plated

(4×10^4 cells/well) on poly-D-lysine-coated 96-well plates (BD Biosciences). Twenty-four hours later, the Hana3A cells were transiently transfected with the pCI-hOR1A1 plasmid, the pCI-RTP1S plasmid (also provided by Dr. H. Matsunami) and the pGlo™-22F cAMP plasmid (Promega) using Fugene® HD (Promega), according to the manufacturer's instructions. In addition, to determine whether the induced activities are OR-dependent, the Hana3A cells were mock transfected with the pcDNA4/To plasmid instead of the OR expression plasmid. The hOR1A1-inducible HEK293S GnTI$^-$ cells were only transfected with the pGlo™-22F cAMP plasmid. Twenty-four hours after transfection, the medium was replaced with a CO_2-independent medium (Life Technologies) supplemented with the GloSensor™ cAMP reagents; the plates were then incubated for 2 h at room temperature. The luminescence intensity was measured for 10 min after the addition of the odorant solution (10 μL) using a Victor 3V plate reader (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). A range of dihydrojasmone concentrations from 0.01 μM to 1 mM was tested. The assays were performed in duplicate and each experiment was repeated at least three times. The dose-response data were fitted using a four-parameter logistic equation. The median effective concentrations (EC_{50} values) were generated using SigmaPlot software.

2.8. Cell extract preparation

Up to sixty T175 tissue culture flasks were used to obtain a significant amount of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 in one run. The hOR1A1-HEK293S GnTI$^-$ cells were seeded at density of 10×10^6 cells per T175 flask and grown for 5 days at 37 °C until they reached 80–90% confluence. The cells were then incubated in a medium containing tetracycline (1 μg/mL) and NaBu (5 mM). After 48 h, the adherent cells and cells in suspension were harvested into ice-cold medium, pelleted by centrifugation at 2000 g for 15 min at 4 °C, and then resuspended in 2 mL of PBS containing a complete protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The cells from each flask ($70–80 \times 10^6$ cells) were then pooled and centrifuged again. The pooled pellet was flash frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until further purification. On the day of purification, the cell pellet was thawed on wet ice. The FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was solubilized by resuspending the cell pellet in ice-cold PBS buffer containing 2% w/v FC14 and a complete protease inhibitor cocktail (2 mL per T175 flask). The cell homogenate was sonicated for 1 min using a Vibracell 750 sonicator (Sonics & Materials, Newtown, USA) equipped with a 2-mm tip and set to 30% of the maximum power. The homogenate was further disrupted by high-speed shaking with a tissue lyser (TissueLyser, Qiagen) for 3 min after carbon beads were introduced into each microtube. Finally, the homogenate was incubated for 4 h at 4 °C under strong agitation using a Vortex Genie II mixer (Scientific Industries, Bohemia, USA) and then centrifuged at 13,000 g for 30 min at 4 °C. The resulting supernatant was immediately submitted to immunoaffinity purification.

2.9. hOR1A1 purification by immunoaffinity chromatography

To purify the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein from cell extract, we used the EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 affinity gel, in which the monoclonal antibody ANTI-FLAG M2 is covalently attached to cross-linked agarose beads. The cell homogenate was mixed with the EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 beads (binding capacity: 0.6 mg/mL) and rotated overnight at 4 °C to capture the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1. The beads were then transferred into Pierce spin columns and collected by centrifugation at 1500 *g* for 1 min. Then, the beads were immediately washed 5 times with cold PBS containing 0.2% FC14. After the last wash, the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 bound to the beads was eluted by competitive elution with 5 one-column volumes of a PBS-0.2% FC14 solution containing 100 mg/mL FLAG peptide.

2.10. Mass spectrometry

The immunoaffinity-purified samples of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein were subjected to SDS-PAGE, and the proteins were stained with Bio-Safe colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad). For the MS analysis, the excised gel bands were washed with a solution containing acetonitrile and 50 mM ammonium bicarbonate (1:1) and digested with modified porcine trypsin (Promega) for 6 h at 37 °C in 50 mM ammonium bicarbonate buffer. After desalting using ZipTip C18 pipette tips (Merck-Millipore), the peptide solutions were spotted onto a MALDI-ToF Voyager DE STR plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), dried and covered with an α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. The samples were then analysed using a mass spectrometer (MALDI-ToF Voyager DE super STR, Applied Biosystems) equipped with a N2 laser as a positive ionization source (337 nm, 20 Hz, reflectron mode with 130 ns extraction delay) available on the PAPPSO platform (INRA, Jouy-en-Josas, France). The mass spectra were analysed using the MS-Fit programme (Protein Prospector, http://prospector.ucsf.edu). The protein identification was based on peptide mass fingerprinting, which aims to compare the masses of the experimental peptides to the theoretical masses of the tryptic peptides from the hOR1A1 genomic sequence in the NCBI Protein database.

2.11. Size exclusion chromatography (SEC)

The FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 samples that had been eluted from the ANTI-FLAG® M2 beads were pooled and concentrated to 3–5 mg/mL using a 10-kDa MWCO filter column (Vivaspin, Sartorius, Aubagne, France). The samples were then subjected to gel filtration chromatography (Superdex 200 10/300GL column) on an Äkta Prime fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The column was equilibrated with 2 column volumes of wash buffer (PBS-0.2% FC14) before the immunopurified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 sample was applied. After loading, the column was rinsed with wash buffer at 0.5 mL/min, and the column flow through was monitored by UV absorbance at 280 nm. The molecular masses of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1-detergent complexes were estimated by calibrating the column with a gel filtration standard mixture (Sigma-Aldrich). The following standard proteins were used: ferritin (443 kDa), β-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), monomeric BSA (66 kDa), chicken egg ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). The protein fractions (1 mL) were collected using an automated fraction collector and subjected to immunoblotting analysis.

2.12. SEC coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) analysis

The oligomeric state of the purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was determined using a SEC column coupled to a MALS detector. SEC was performed using a Silica Gel WTC-MP015S5 column (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA) and eluted with PBS containing 0.2% FC14 (pH 7.3) at 0.5 mL/min. The protein was detected with a triple-angle light scattering detector (Mini-DAWN™ TREOS, Wyatt Technology) connected to a UV detector (UV 100 SpectraSeries, Thermo Separation Products, Waltham, MA, USA) operating at a wavelength of 280 nm and a

differential refractometer (RiD-10A, Shimadzu, Noisiel, France). The concentration of the protein sample was adjusted to 0.5 mg/mL. A 100 μL volume of the samples were injected onto the column. The molecular weight and hydrodynamic radius of the protein-detergent complexes were determined with the ASTRA VI software (Wyatt Technology). A specific refractive index increment (dn/dc value), which was estimated at 0.185 mL/g, was used for the mass calculation. The suitability of the system was assessed by analysing the standard protein BSA (66 kDa).

2.13. hOR1A1 secondary structure analysis with circular dichroism spectroscopy

The circular dichroism (CD) spectra of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 samples were recorded at 20 °C at wavelengths ranging from 190 to 260 nm using a spectropolarimeter equipped with a Peltier temperature control unit (J-815, Jasco, Bouguenais, France). The CD spectra were corrected for the buffer and ligand contributions and converted to mean residue ellipticity in deg.cm^2.dmol^{-1}. The spectra that were recorded in absence and in presence of 10 μM dihydrojasmone were averaged over 5 scans accumulated at 0.5 nm intervals with a 50 nm/min scan speed and 5-s response times. They were smoothed using the Stavitzky-Golay convolution filter with a span of 5. The secondary structure proportions were estimated using the deconvolution CDSSTR algorithm available on the DichroWeb website (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml) [36].

2.14. Odorant-hOR1A1 binding measurements using fluorescence spectroscopy

The tryptophan fluorescence spectra were recorded with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian Instruments, Les Ulis, France) equipped with a Peltier temperature control unit. The temperature was maintained at 20 °C. Samples of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein (0.25 μM in PBS-0.2% FC14 buffer) were excited at 280 nm and the emission spectra were recorded from 300 to 400 nm, with a 5-nm bandwidth for both excitation and emission, in the presence and absence of odorants. The odorant solutions were freshly prepared in PBS-0.2% FC14 buffer. Successive aliquots of the odorant solutions were added to 1 mL of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 solution. A range of odorant concentrations from 0.1 nM to 50 μM (dihydrojasmone) or 0.1 nM to 100 μM (carvone, 3-octanone, citral and citronellal) was tested. The fluorescence measurements were corrected for bleaching and nonspecific buffer quenching. The dissociation constants (K_d) were calculated from a plot of the fluorescence intensity measured at the emission maximum wavelength (350 nm) versus the concentration of total ligand obtained with a standard nonlinear regression method using SigmaPlot software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). The reported K_d values are the average of triplicate measurements performed on three independently purified protein samples.

3. Results

3.1. Selection of stable hOR1A1-inducible HEK293S GnTI$^-$ cell clones

After transfection with the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 plasmid and antibiotic selection, twenty-four HEK293S GnTI$^-$ cell clones were subjected to induction in media supplemented either with tetracycline (1 μg/mL) or with a combination of tetracycline (1 μg/mL) and NaBu (5 mM) for 48 h. SDS-PAGE and western blot analysis of the cell lysates using the anti-rho1D4 monoclonal antibody revealed that 15 clones produced high amounts of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 when the cells were induced with a combination of tetracycline and NaBu. FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 expression was not detected in the absence of NaBu. The level of induced hOR1A1 expression in some clones is shown in Fig. 1A. Clone 16 showed the highest level of induction and maintained an undetectable background level in the absence of any treatment. Because of its ability to produce FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 for at least 30 passages, this clone was selected for the subsequent experiments (Fig. 1B). A western blot analysis of clone 16 revealed the presence of two major bands at approximately 26 and 44 kDa. Usually, membrane proteins migrate at 70–85% of their theoretical molecular weight, which may be due to incomplete denaturation of the protein [37,38]. Therefore, the true molecular weight of the protein migrating at 26 kDa would be approximately 35 kDa, which is consistent with the theoretical molecular weight of hOR1A1 (36.7 kDa for the full-length FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1). Consequently, the bands with apparent molecular weights of 26 and 44 kDa correspond to monomeric and dimeric forms of the protein, respectively.

3.2. Impact of the sodium butyrate concentration on hOR1A1 induction

Cell-based immunocytochemistry experiments were performed to assess the impact of the NaBu concentration on FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 expression in the clone showing the highest expression (clone 16). The induction of hOR1A1 expression in

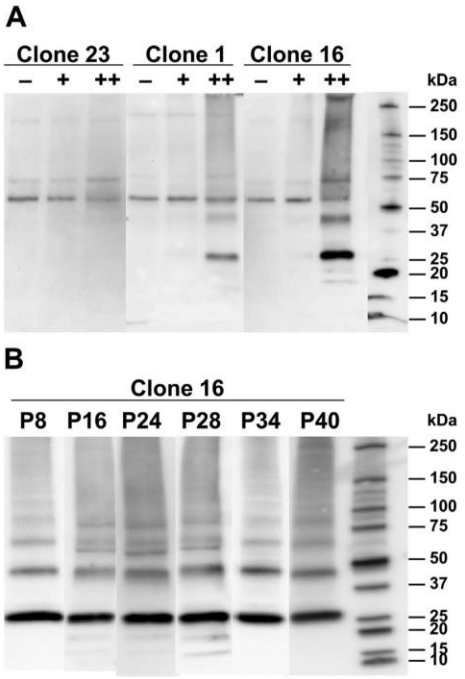

Fig. 1. Western blot analyses of HEK293S GnTI$^-$ cell clones that were stably transfected with the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 plasmid. The cell clones were treated with plain media (−) or media supplemented with 1 μg/mL tetracycline (+) or tetracycline plus 5 mM NaBu (++) for 48 h. The levels of hOR1A1 in the cell lysates were probed with SDS-PAGE western blotting using the rho1D4 antibody (A: 25 μg protein/well; B: 10 μg protein/well). **A**: hOR1A1 expression was induced in clones 1 and 16, which were treated with tetracycline and NaBu, whereas no induction was detected in clone 23. Clone 16 showed the highest level of induction and, therefore, was selected for all subsequent experiments. **B**: Clone 16 was able to produce hOR1A1 for at least 30 passages.

HEK293S GnTI$^-$ cells treated with a combination of tetracycline (1 μg/L) and increasing concentrations of NaBu (from 0.1 mM to 5 mM) was analysed. Significant hOR1A1 expression was observed in the cells treated with NaBu concentrations ≥2 mM (Fig. 2A); the highest hOR1A1 expression was observed in the cells treated with 5 mM NaBu. Moreover, cell rounding and detachment from the flask floor were observed at this concentration. The subcellular localization of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was investigated using two-photon confocal microscopy. The immunochemical staining of the cells that were induced with a combination of tetracycline (1 μg/mL) and NaBu (5 mM) showed that the expressed hOR1A1 protein is mainly localized to the plasma membrane (Fig. 2B). These observations indicate that a substantial portion of the hOR1A1 protein produced by the inducible HEK293S cells is trafficked to the cell surface. Taken together, these observations prompted us to use an induction treatment consisting of 1 μg/mL of tetracycline and 5 mM NaBu for the subsequent experiments.

3.3. Functional activity of hOR1A1-expressing cells, as measured by a real-time cAMP assay

To analyse the receptor functionality, we measured receptor activation using a real-time cAMP assay. Dihydrojasmone, one of the best known agonists of hOR1A1, was selected for this study [5]. As shown in Fig. 3A, FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was activated by dihydrojasmone in the tetracycline- or tetracycline- and NaBu-treated HEK293S GnTI$^-$ cells in a concentration-dependent manner, leading to EC_{50} values of 36.5 ± 1.9 μM and 23.6 ± 1.9 μM, respectively. A slight activation was observed in the untreated cells stimulated with dihydrojasmone suggesting that a basal receptor expression level occurs under non-inducing conditions. Basal leaky expression of proteins is known to occur using tetracycline-controlled systems [39,40]. It is most likely due to the weak binding of the tetracycline-inducible transcriptional activator to its operator sequence, even in the absence of tetracycline. Because unglycosylated state could potentially interfere with the receptor functionality [41], we also investigated hOR1A1 activation in HEK293T cells with normal glycosylation, the Hana3A cells, which were transfected with the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 vector (Fig. 3B). In these cells, dihydrojasmone enhanced the intracellular cAMP levels, with a mean EC_{50} value of 4.6 μM, regardless of whether the cells were treated with tetracycline and NaBu. No activation was observed in the mock-transfected cells. This result is in the same range as the EC_{50} value (1.1 μM) measured in Hana3A cells that were transiently transfected with a pCI plasmid (pCI-hOR1A1-rho), a vector that is classically used to study the functionality of mammalian ORs in cellular assays [5,42]. These data demonstrated that the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 vector allows us to overexpress a fully functional recombinant OR in HEK293S GnTI$^-$ cells and in cells producing heterogeneous

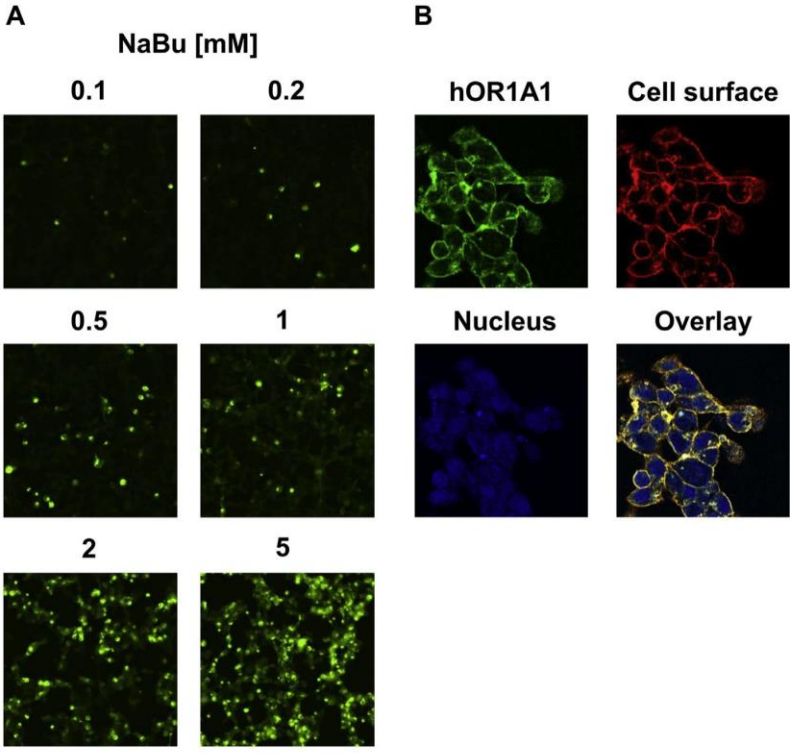

Fig. 2. Immunocytochemistry of the hOR1A1-inducible HEK293S cells treated with tetracycline and NaBu. A: Cells from clone 16 were treated with 1 μg/mL tetracycline and increasing concentrations of NaBu (0.1–5 mM) for 48 h. The level of the induced hOR1A1 protein was assessed using an anti-FLAG M2 antibody. The cells that were treated with 1 μg/mL tetracycline and 5 mM NaBu exhibited the highest protein levels. **B**: Cellular localization of hOR1A1 in the stably transfected HEK293S GnTI$^-$ cells treated with both 1 μg/mL tetracycline and 5 mM NaBu. The cell surface (shown in red) is detected by biotin-conjugated concanavalin A and avidin-conjugated TRITC. The hOR1A1 receptor (shown in green) was detected using a primary anti-FLAG M2 antibody and a fluorescently labelled secondary antibody (AlexaFluor 488). The nuclei (shown in blue) were stained with DAPI. The overlay images indicate the localization of the receptor at the cell surface (shown in yellow). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

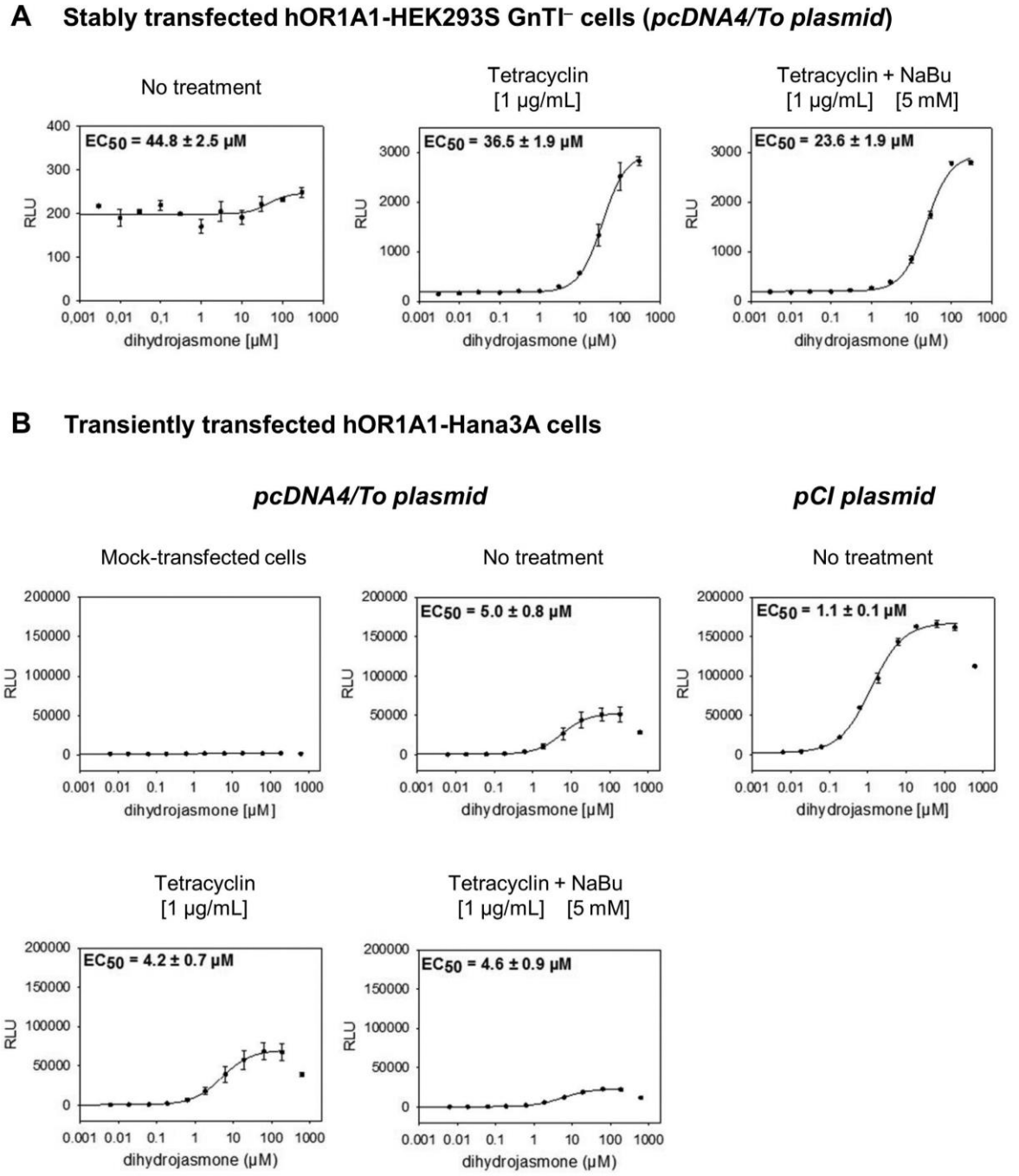

Fig. 3. Functional tests of the hOR1A1-transfected HEK293 cells using the GloSensor assay. The hOR1A1 activity was measured in the HEK293S GnTI⁻ (**A**) and Hana3A cells (**B**) that had been stably or transiently transfected with the pcDNA4/To-FLAG-hOR1A1-rho1D4 plasmid, respectively. The cells were treated with tetracycline (1 µg/mL) or tetracycline (1 µg/mL) and NaBu (5 mM) for 48 h before the test. For comparison, the hOR1A1 activity was also assessed in Hana3A cells that had been transiently transfected with the pCI-hOR1A1 vector. A cAMP-mediated luciferase assay (GloSensor assay) was used to measure the receptor activity after the cells were stimulated with dihydrojasmone. The data were fitted with sigmoid dose-response curves and the EC_{50} values were calculated using Sigma Plot software. The results are shown as the means ± S.E.M. of at least three independent experiments. Dihydrojasmone induced similar dose-response curves in the hOR1A1-expressing HEK293S GnTI⁻ cells and in the Hana3A cells that were transiently transfected with the pcDNA4/To vector. These curves were similar to that observed in the Hana3A cells transfected with the pCI vector.

complex N-glycans. Moreover, the similar EC_{50} values for dihydrojasmone in both cell lines suggest that the glycosylation pattern would not affect the receptor's functionality.

3.4. Large-scale purification and subsequent characterization of hOR1A1

To produce large amounts of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein for the characterization and binding studies, up to sixty T175 flasks were seeded with the hOR1A1-inducible HEK293S cells. The flasks were treated with tetracycline (1 μg/mL) and NaBu (5 mM) for 48 h before the cells were harvested. The FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was solubilized from the cell membranes using FC14 (2% w/v). This detergent was chosen because it was highly effective in the solubilization and subsequent purification of ORs [28–30]. Following the solubilization procedure, the receptor was fully captured by the EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 beads. No FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was detected in the western blots of the flow-through fraction. The bound receptor was then eluted by the addition of an excess amount of FLAG peptide. Because detergent concentrations can have a critical effect on protein stability and function, the purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was solubilized in a PBS solution containing 0.2% FC14 (critical micelle concentration (CMC) in water 0.0046%). A Coomassie blue SDS-PAGE analysis of the protein purified by anti-FLAG M2 affinity chromatography showed a major 30 kDa band and two less intense 51 and 70 kDa bands (Fig. 4). The protein bands were excised from the Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel and identified by peptide mass fingerprinting using tryptic cleavage and MALDI-ToF mass spectrometry. Five peptide fragments covering 15.8% of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein were identified in the sample corresponding to the 30 kDa band. These results confirmed the presence of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 in the 30 kDa protein band. The protein detected in the 51 kDa band was not identified, due to the high background noise resulting from keratin contamination, while the protein present in the highest band was identified as a 70 kDa heat shock protein (Hsp70).

To further purify the receptor and to remove the FLAG peptide, the immunoaffinity-purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was subjected to SEC analysis. Five peaks were observed (Fig. 5A). A column calibration procedure using protein standards indicated that peaks 2, 3 and 4 have apparent molecular masses of 158 kDa, 78 kDa and 36 kDa, respectively, suggesting that these peaks might correspond to the tetrameric, dimeric and monomeric states of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 (Fig. 5B). Peaks 1 and 5 correspond to aggregates and the FLAG peptide, respectively. An analysis of the different eluted fractions by SDS-PAGE and western blotting using the anti-FLAG M2 antibody showed that peak 4 (fractions 15–16) mainly contained monomeric FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1, while peak 3 (fractions 13–14) contained both the monomeric and dimeric forms (Fig. 5C). The fractions corresponding to peak 2 (fractions 10–12) mainly contained the oligomerized forms. The total yield of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein from peak 4 (monomeric form), which was obtained from sixty T175 flasks, was approximately 1.6 mg (26 μg/flask, i.e. 0.3 μg/10^6 cells in terms of cell productivity). Approximately 1.1 and 0.7 mg of the dimeric and oligomerized forms (corresponding to peaks 3 and 2, respectively) were purified from sixty T175 flasks. The FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein samples corresponding to the monomeric form were pooled and used for the CD spectroscopy and ligand binding studies.

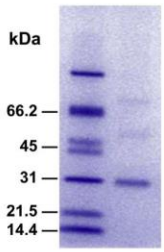

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of immunoaffinity-purified hOR1A1. The proteins were stained with Coomassie blue. The 30, 51 and 70 kDa protein bands were excised from the gels and subjected to a MALDI-ToF mass spectrometry analysis after trypsin digestion.

To confirm the oligomerization state of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1, the fractions corresponding to peaks 2, 3 and 4 (fractions 10–16) were pooled and analysed using an online SEC coupled with MALS, RI, and UV detectors. SEC-MALS determines the direct molecular mass of protein-detergent complexes and does not require a calibration curve [43]. Nevertheless, because the protein is obtained in FC14 and its concentration in buffer could not be decreased under the CMC or exchanged with another detergent such as *n*-dodecyl-β-D-maltoside without total aggregation, the quality of the chromatographic data was validated by calibration with known molecular markers (such as BSA) in the same buffer, as recommended for membrane protein-detergent complexes (data not shown) [44]. The protein detergent complex containing a BSA monomer is reasonably resolved, with a molecular weight of 66.5 kDa. Compared to the UV/visible signal, the light scattering is more sensitive to the high molecular weight oligomers. Fig. 6 shows the UV_{280} nm-LS (90° angle)-RI overlay of purified hOR1A1. The analysis revealed the presence of two main oligomeric forms, with measured masses of 127 kDa and 61 kDa, respectively. The theoretical mass of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was 36.7 kDa; thus, hOR1A1 appeared as a mixture of monomers and dimers associated with detergents (approximately 64 and 140 detergent molecules would be associated with the monomeric and dimeric forms, respectively). The SEC-MALS analysis of the linear and cumulative distribution of the molar mass confirmed that the monomers and dimers represented 50% and 30% of the total amount, respectively. Aggregates (oligomeric forms) were also detected (20% of the total amount), but actually represented less than 1% of the total, as the aggregates contributed the strongest signal. These data indicated that the monomeric form is the major form of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 that is produced and purified using our experimental conditions.

3.5. Secondary structure analysis of recombinant hOR1A1

CD spectroscopy was used to confirm the structural integrity of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 purified by SEC (peak 4). The far-UV spectrum of purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 displayed a positive peak centred at 193 nm and two negative peaks at 208 and 222 nm (Fig. 7), which clearly shows the helical character of the protein. The deconvolution of the CD spectrum revealed that FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was approximately 44% α-helix and 19% β-sheet. This composition is consistent with the theoretical prediction of the hOR1A1 secondary structure (66% α-helix based on a model built from the β2-adrenergic crystalline structure [45]) and is consistent with the secondary structures of other purified ORs [29,30]. This suggests that the HEK293-expressed FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein is properly folded. We subsequently determined whether FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 undergoes a ligand binding-dependent conformational change. The addition of 10 μM dihydrojasmone resulted in significant changes in the far-UV CD spectrum of the protein (Fig. 7). This finding indicates that

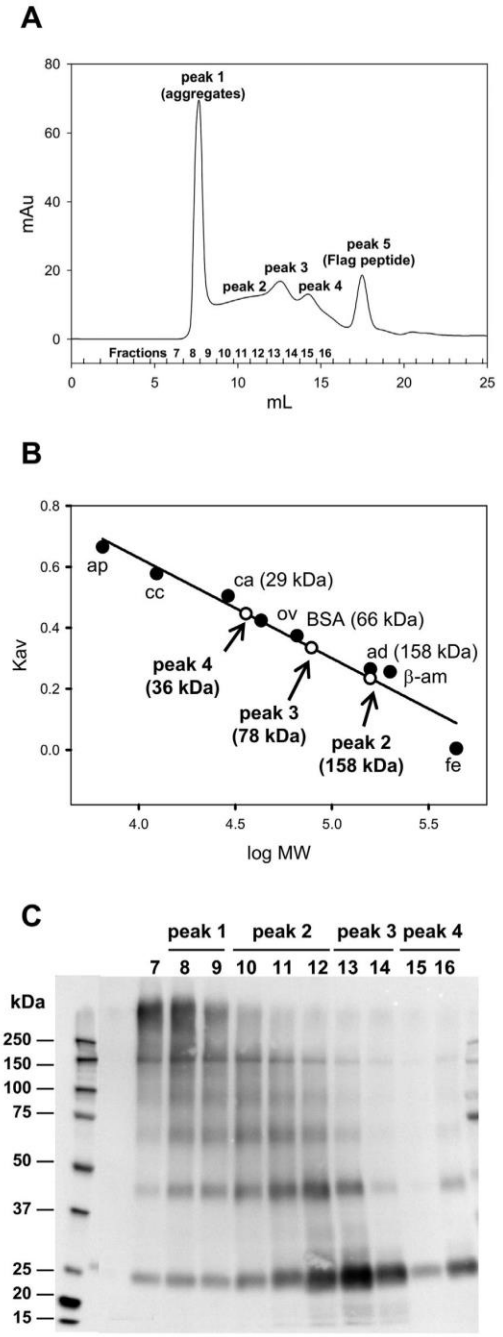

Fig. 5. Size exclusion chromatography of immunoaffinity-purified hOR1A1. **A**: The SEC analysis was performed on an Äkta Prime FPLC system equipped with a Superdex 200 10/300GL column. Immunoaffinity-purified hOR1A1 was eluted with PBS-FC14 0.2% (pH 7.3). Five distinct peaks were observed, suggesting the presence of several forms of the protein. **B**: A set of protein markers was used to calibrate the column: ferritin (fe, 440 kDa), β-amylase (β-am, 200 kDa), aldolase (ad, 158 kDa), monomeric BSA (BSA, 66 kDa), chicken egg ovalbumin (ov, 43 kDa), carbonic anhydrase (ca, 29 kDa), cytochrome C (cc, 12.4 kDa) and aprotinin (ap, 6.5 kDa). The proteins that eluted in peaks 2, 3 and 4 have apparent molecular masses of 159 kDa, 79 kDa and 37 kDa, respectively. **C**: The peak fractions (10 μL) were analysed by SDS-PAGE and western blotting using the anti-FLAG M2 antibody. The peak (Pk) and fraction numbers refer to those designated in A. Peak 4 (fractions 15–16) contained mainly monomeric hOR1A1, while peak 3 (fractions 13–14) contained both the monomeric and dimeric forms. Higher oligomeric forms were detected in peak 2 (fractions 10–12).

FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 undergoes structural changes when a ligand binds to the receptor, further supporting the hypothesis that the receptor is functional.

3.6. Ligand binding properties of hOR1A1

To characterize the interactions of purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 with its ligands, we determined the dose-response relationship of its intrinsic tryptophan fluorescence upon titration with odorant molecules. For this study, we selected a panel of molecules that were previously shown to be agonists of hOR1A1 using functional assays [5,15]. Dihydrojasmone was found to be the best ligand; it induced a decrease in the peak fluorescence intensity of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1, exhibiting a K_d value of 554 ± 9 nM (Fig. 8A). The other tested odorants (carvone, 3-octanone, citral and citronellal) bound FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 with a lower affinity (K_d values ranging from 6 to 12 μM) (Fig. 8B). These data demonstrated that the purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein was functional and able to bind odorant molecules.

4. Discussion

ORs represent the largest GPCR family in humans and are encoded by approximately 400 genes [46]. Most ORs are expressed in the main olfactory epithelium, where they play a crucial role in odorant detection. Additionally, there is increasing evidence of the expression of ORs in other tissues throughout the body. However, in most cases, the physiological significance of this ectopic expression is not fully elucidated [47,48]. Interestingly, OR1A1 expression has been detected in human hepatocytes [49]. In these cells, OR1A1 would be involved in the regulation of triglyceride metabolism. Currently, the rules that govern odorant-OR interactions are largely unknown. Therefore, the determination of the OR structure is crucial for understanding the mechanisms of ligand binding, receptor activation, and signal transduction. This information can be obtained through experimental biophysical techniques, which require large quantities of pure receptor.

From this perspective, we have overexpressed the codon-optimized human OR hOR1A1 gene with a FLAG epitope tag in the N-terminal region in the tetracycline-inducible HEK293S GnTI$^-$ cell line gene by incubating the cells with NaBu. The introduction of the FLAG epitope has proved to be a useful method for efficiently purifying the recombinant transmembrane proteins [50]. Western blot screening showed that there was no detectable basal expression in the absence of NaBu, whereas this compound strongly induced the expression of the FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein in a number of clones when it was added to the culture media with tetracycline. NaBu exerted a concentration-dependent effect. In accord with previous studies [28,32], the highest yield of FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 was produced when cells were treated with 5 mM NaBu for 48 h. We successfully produced a high amount of the purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein. The expression level was 10-fold higher than what was previously reported for hOR17-4 [28]. The CD analyses indicated that the purified receptor was properly folded into an α-helical structure, in agreement with the expected secondary structures for a GPCR [51,52].

We used SEC-MALS to determine the molecular mass of the purified FLAG-rho1D4-tagged hOR1A1 protein. This analysis revealed that recombinant hOR1A1 is heterogeneous in its

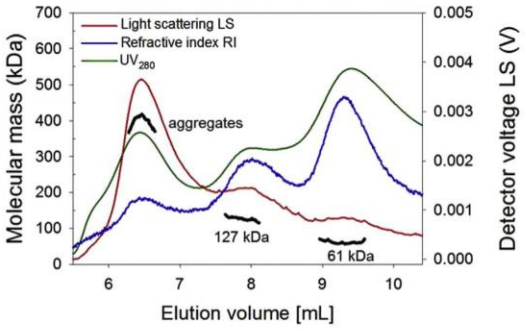

Fig. 6. Analysis of the oligomeric state of purified hOR1A1 by SEC-MALS. Fractions corresponding to peaks 2, 3 and 4 observed in the previous SEC analysis (see Fig. 4) were pooled and subjected to a weight analysis using SEC coupled to a triple-angle light scattering detector, a UV detector (280 nm) and a differential refractometer. The numbers printed next to the peaks are the average MW values (kDa) for the entire peak. Two main oligomeric forms with measured masses of 127 kDa and 61 kDa were detected, indicating the presence of monomeric and dimeric hOR1A1 forms associated with detergents.

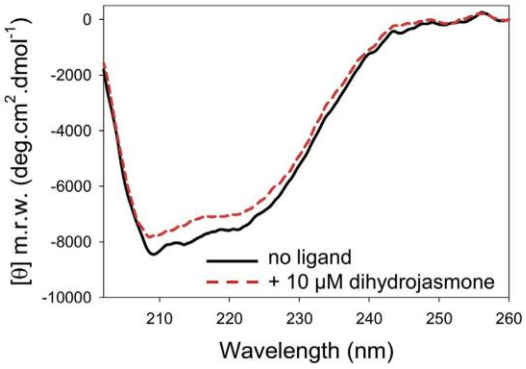

Fig. 7. Secondary structure analysis of purified hOR1A1 using circular dichroism spectroscopy. The far-UV CD spectra of purified hOR1A1 were established in the absence (solid line) and presence of 10 µM dihydrojasmone (dashed line). The spectra show the presence of α-helical secondary structures. Dihydrojasmone induces modifications in the CD spectrum, indicating an interaction with hOR1A1.

oligomeric state. Monomeric and dimeric hOR1A1 and aggregates were observed, with the monomeric and dimeric forms as the predominant forms (47% and 32%, respectively). Interaction analyses performed on another human OR support our observation that hOR1A1 can form homodimers. Using bioluminescence resonance energy transfer, Wade et al. [53] showed that the human receptor OR17-40 exists as constitutive homodimer and demonstrated that ligand binding causes conformational changes in the dimer. A growing body of data obtained from different experimental approaches indicates that class A GPCRs are able to form dimeric or oligomeric complexes, even in native tissues [52,54–57]. The effects of dimerization on receptor signalling are suggested to have significant physiological and pharmacological consequences (a role in receptor trafficking or function, for instance) [58–62].

To characterize the functional integrity of the purified hOR1A1 protein, we measured the binding affinity of odorants that have been previously shown to activate this OR in cellular assays [5,15]. The interaction between hOR1A1 and its ligands was studied by monitoring the changes in the intrinsic tryptophan fluorescence. The fluorescence of tryptophan is highly sensitive to its environment, making it a good choice for reporting protein conformation changes and interactions with other molecules. This approach has been widely used to characterize the structure and dynamics of many proteins; it has been implemented to measure binding properties of some GPCRs [51,63–65]. Because the hOR1A1 amino acid sequence contains two tryptophan residues (W153 and W159) (Fig. S1), we used this method to measure the functional properties of the purified protein. Note that the W153 residue is a highly conserved amino acid residue in trans-membrane (TM) domain TM4 of ORs and GPCRs [19]. The tested odorants quenched the intrinsic fluorescence of hOR1A1 with an affinity in the micromolar range, and dihydrojasmone was the most efficient ligand tested (K_d ~ 0.5 µM). These values fit well with the EC_{50} values measured using functional assays [5,15] and are also consistent with the affinities measured for mammalian ORs purified from HEK293 cells or cell-free systems [29,66–68]. Our finding that dihydrojasmone is a potent ligand of hOR1A1 may be of interest for further structural studies. Indeed, ligands are thought to stabilize different subsets of GPCR structural conformations [69,70]. This property has been used to crystallize a number of GPCRs in their functional states [71–74].

As mentioned above, intrinsic tryptophan fluorescence offers the potential to sense the real-time molecular interactions between a protein and its ligand. To activate an OR, the odorant must interact with the amino acid residues located in the binding pocket of the OR. By combining homology modelling, site-directed mutagenesis and functional expression, Schmiedeberg et al. [15] proposed that 17 specific amino acid positions within the TM2-7 domains of hOR1A1 were the structural determinants of odorant binding. Some of these amino acids are in the immediate vicinity of the tryptophan residues (see Fig. 4a in Ref. [15]), suggesting that the changes in tryptophan fluorescence could result from an interaction of the ligands with these amino acids. The ligand-induced conformational change in the receptor can also modify the tryptophan fluorescence. Upon agonist binding, many GPCRs have been shown to switch from an inactive to an active form that is coupled with the intracellular G protein to trigger signal transduction [75] [45,76,77]. Recent molecular dynamics simulation studies suggested that this tilting mechanism would also occur during the OR activation process [19]. De March et al. identified an ionic lock located between the "DRY" motif in TM3 and a positively charged "R/K" residue in TM6. This would open a cleft in the intracellular part of the bundle to favour G protein coupling. These molecular mechanisms are likely associated with a conformational change in the protein. This hypothesis is supported by our CD analysis, which showed that dihydrojasmone induces a modification in the secondary structure of hOR1A1.

Mammalian heterologous expression systems cells have unique advantages for the expression of GPCRs because they can provide a native-like environment, which facilitates membrane insertion and post-translational modifications. The main drawback, however, is that a detergent must be used to effectively extract the receptors from the membrane and maintain their native conformation in solution. We selected FC14 to purify hOR1A1 because this detergent was shown to efficiently purify OR17-4 and other GPCRs in previous studies [26,29,52]. FC14 again demonstrated its effectiveness in this study because the CD and ligand binding analyses showed that the structure and biological function of hOR1A1 were preserved in the conditions described in this paper. In a recent study, Jamshad et al. [78] reported that it is possible to solubilize and purify a functional GPCR from HEK293 cells in the total absence of detergent by directly encapsulating the transmembrane protein in a nanoscale styrene maleic acid lipid particle. These new technologies need to be considered for the subsequent analysis of the OR's functional and structural properties.

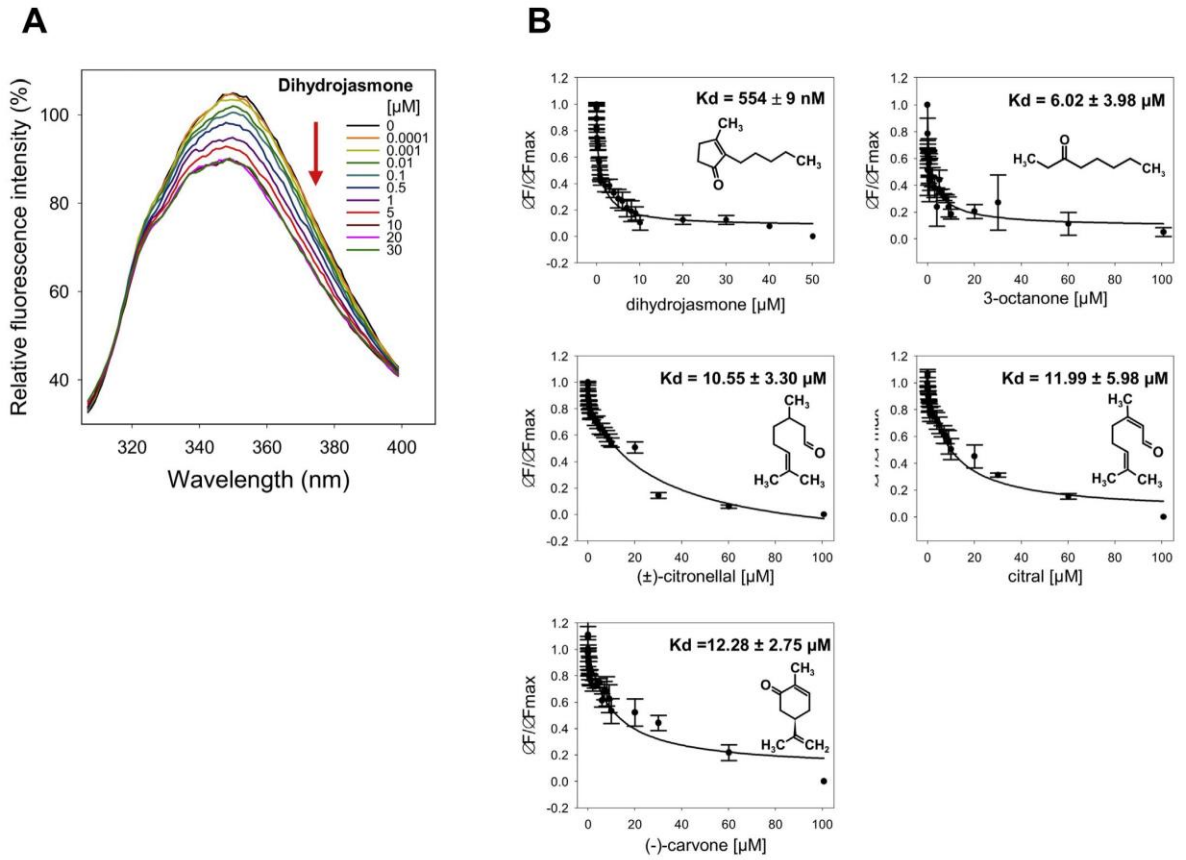

Fig. 8. Binding activity of purified hOR1A1 using intrinsic tryptophan fluorescence. Odorant binding was measured in real time using a spectrofluorimeter. **A**: Titration curve of hOR1A1 with dihydrojasmone. The amplitudes of the responses were normalized to those induced by hOR1A1 in the absence of ligand (λexc = 280 nm, λem = 300–400 nm). Dihydrojasmone decreased the fluorescence intensity of hOR1A1 in a concentration-dependent manner. **B**: Dose-response relationship of hOR1A1 fluorescence (λexc = 280 nm, λem = 340 nm) following odorant application. The data were fitted with sigmoid dose-response curves using Sigma Plot software. The reported K_d values are the average of triplicate measurements from three independently purified protein samples. Of the tested odorants, dihydrojasmone was found to be the most potent hOR1A1 ligand.

In conclusion, we have successfully used the inducible HEK293S GnTI$^-$ cell line to overproduce properly folded and functional hOR1A1. The obtained quantity of purified receptor was compatible with biophysical studies and allowed us to measure the odorant affinity. The strategy described in this paper could be applied to the production of large amounts of other ORs to provide more insights into the molecular mechanisms involved in OR–ligand coupling. Biochemical tests and screens of large compound libraries combined with site-directed mutagenesis are now possible. In addition, this approach paves the way for future crystallographic and NMR studies. Our work also provided evidence that hOR1A1, similar to other class A GPCRs, can assemble into dimers or higher-order oligomers. Future studies should further investigate the structural properties of these oligomers and assess the relevance of oligomerization for OR function.

Author contributions

CB, FN, LB and AMLB conceived and designed the experiments. CB and MLML performed the experiments. CB, FN, LB and AMLB analysed the data. CB, FN, LB, AMLB wrote the paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (Nutrition, Chemical Food Safety and Consumer Behaviour Division), the Regional Council of Burgundy, France (grant number 29000529) and the FEDER (European Funding for Regional Economical Development; grant number PRESAGE 34109). We thank the Plateau Technique PIMS of the DImaCell platform (University of Burgundy, Dijon, France) and the PAPPSO platform (INRA, Jouy-en-Josas, France) for technical assistance with the two-photon confocal microscopy and mass spectrometry analyses, respectively. We are grateful to Dr. P.J. Reeves (University of Essex, U.K.) for the kind gift of the HEK293S GnTI$^-$ cells and to Dr. H. Matsunami (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) for the generous gift of the Hana3A cells and the expression vectors carrying the OR1A1 gene (pCI-OR1A1) and RTP1S gene (pCI-RTP1S). A.M. Le Bon also thanks C. Desmetz (INRA, Dijon, France) for her help in producing the hOR1A1 expression vector.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2016.09.006.

References

[1] S. Pifferi, A. Menini, T. Kurahashi, Signal transduction in vertebrate olfactory cilia, in: A. Menini (Ed.), The Neurobiology of Olfaction, CRC Press, Boca Raton (FL), USA, 2010, pp. 203–224.
[2] S. DeMaria, J. Ngai, The cell biology of smell, J. Cell Biol. 191 (2010) 443–452.
[3] J.P. Rospars, Y. Gu, A. Gremiaux, P. Lucas, Odour transduction in olfactory receptor neurons, Chin. J. Physiol. 53 (2010) 364–372.
[4] R.C. Araneda, Z. Peterlin, X. Zhang, A. Chesler, S. Firestein, A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium, J. Physiol. Lond. 555 (2004) 743–756.
[5] H. Saito, Q. Chi, H. Zhuang, H. Matsunami, J.D. Mainland, Odor coding by a mammalian receptor repertoire, Sci. Signal 2 (2009) ra9.
[6] K. Nara, L.R. Saraiva, X. Ye, L.B. Buck, A large-scale analysis of odor coding in the olfactory epithelium, J. Neurosci. 31 (2011) 9179–9191.
[7] J.D. Mainland, A. Keller, Y.R. Li, T. Zhou, C. Trimmer, L.L. Snyder, A.H. Moberly, K.A. Adipietro, W.L. Liu, H. Zhuang, S. Zhan, S.S. Lee, A. Lin, H. Matsunami, The missense of smell: functional variability in the human odorant receptor repertoire, Nat. Neurosci. 17 (2014) 114–120.
[8] E. Block, S. Jang, H. Matsunami, S. Sekharan, B. Dethier, M.Z. Ertem, S. Gundala, Y. Pan, S. Li, Z. Li, S.N. Lodge, M. Ozbil, H. Jiang, S.F. Penalba, V.S. Batista, H. Zhuang, Implausibility of the vibrational theory of olfaction, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (2015) E2766–E2774.
[9] L. Buck, R. Axel, A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, Cell 65 (1991) 175–187.
[10] B. Malnic, P.A. Godfrey, L.B. Buck, The human olfactory receptor gene family, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 2584–2589.
[11] D.M. Rosenbaum, S.G. Rasmussen, B.K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors, Nature 459 (2009) 356–363.
[12] M. Audet, M. Bouvier, Restructuring G-protein-coupled receptor activation, Cell 151 (2012) 14–23.
[13] D. Latek, A. Modzelewska, B. Trzaskowski, K. Palczewski, S. Filipek, G protein-coupled receptors–recent advances, Acta Biochim. Pol. 59 (2012) 515–529.
[14] D. Milic, D.B. Veprintsev, Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies, Front. Pharmacol. 6 (2015) 1–24.
[15] K. Schmiedeberg, E. Shirokova, H.-P. Weber, B. Schilling, W. Meyerhof, D. Krautwurst, Structural determinants of odorant recognition by the human olfactory receptors OR1A1 and OR1A2, J. Struct. Biol. 159 (2007) 400–412.
[16] L. Gelis, S. Wolf, H. Hatt, E.M. Neuhaus, K. Gerwert, Prediction of a ligand-binding niche within a human olfactory receptor by combining site-directed mutagenesis with dynamic homology modeling, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 51 (2012) 1274–1278.
[17] G. Launay, S. Teletchea, F. Wade, E. Pajot-Augy, J.F. Gibrat, G. Sanz, Automatic modeling of mammalian olfactory receptors and docking of odorants, Prot. Eng. Des. Sel. 25 (2012) 377–386.
[18] S. Sekharan, M.Z. Ertem, H. Zhuang, E. Block, H. Matsunami, R. Zhang, J.N. Wei, Y. Pan, V.S. Batista, QM/MM model of the mouse olfactory receptor MOR244-3 validated by site-directed mutagenesis experiments, Biophys. J. 107 (2014) L5–L8.
[19] C.A. de March, Y. Yu, M.J. Ni, K.A. Adipietro, H. Matsunami, M. Ma, J. Golebiowski, Conserved residues control activation of mammalian G protein-coupled odorant receptors, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 8611–8616.
[20] E.C. McCusker, S.E. Bane, M.A. O'Malley, A.S. Robinson, Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures, Biotechnol. Prog. 23 (2007) 540–547.
[21] P.L. Pham, A. Kamen, Y. Durocher, Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein, Mol. Biotechnol. 34 (2006) 225–237.
[22] J. Andrell, C.G. Tate, Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies, Mol. Membr. Biol. 30 (2013) 52–63.
[23] P.J. Reeves, N. Callewaert, R. Contreras, H.G. Khorana, Structure and function in rhodopsin: high-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 13419–13424.
[24] P. Chelikani, P.J. Reeves, U.L. Rajbhandary, H.G. Khorana, The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line, Protein Sci. 15 (2006) 1433–1440.
[25] L. Gan, J.M. Alexander, A. Wittelsberger, B. Thomas, M. Rosenblatt, Large-scale purification and characterization of human parathyroid hormone-1 receptor stably expressed in HEK293S GnTI- cells, Protein Expr. Purif. 47 (2006) 296–302.
[26] X. Wang, S. Zhang, Production of a bioengineered G-protein coupled receptor of human formyl peptide receptor 3, Plos One 6 (2011) e23076.
[27] S. Xiao, J.F. White, M.J. Betenbaugh, R. Grisshammer, J. Shiloach, Transient and stable expression of the neurotensin receptor NTS1: a comparison of the baculovirus-insect cell and the T-REx-293 expression systems, Plos One 8 (2013) e63679.
[28] B.L. Cook, K.E. Ernberg, H. Chung, S. Zhang, Study of a synthetic human olfactory receptor 17-4: expression and purification from an inducible mammalian cell line, Plos One 3 (2008) e2920.
[29] B.L. Cook, D. Steuerwald, L. Kaiser, J. Graveland-Bikker, M. Vanberghem, A.P. Berke, K. Herlihy, H. Pick, H. Vogel, S.G. Zhang, Large-scale production and study of a synthetic G protein-coupled receptor: human olfactory receptor 17-4, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 11925–11930.
[30] K.-J. Leck, S. Zhang, C.A.E. Hauser, Study of bioengineered zebra fish olfactory receptor 131-2: receptor purification and secondary structure analysis, Plos One 5 (2010) e15027.
[31] A. Stary, C. Suwattanasophon, P. Wolschann, G. Buchbauer, Differences in (-) citronellal binding to various odorant receptors, Biochem. Biophys. Res. Comm. 361 (2007) 941–945.
[32] P.J. Reeves, J.M. Kim, H.G. Khorana, Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 13413–13418.
[33] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265–275.
[34] F. Fan, B.F. Binkowski, B.L. Butler, P.F. Stecha, M.K. Lewils, K.V. Wood, Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase, ACS Chem. Biol. 3 (2008) 346–351.
[35] H. Saito, M. Kubota, R.W. Roberts, Q.Y. Chi, H. Matsunami, RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors, Cell 119 (2004) 679–691.
[36] L. Whitmore, B.A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, Nucleic Acids Res. 32 (2004) W668–W673.
[37] M. Wang, B. Ge, R. Li, X. Wang, J. Lao, F. Huang, Milligram production and biological activity characterization of the human chemokine receptor CCR3, Plos One 8 (2013) e65500.
[38] A. Rath, M. Glibowicka, V.G. Nadeau, G. Chen, C.M. Deber, Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 1760–1765.
[39] J.R. Howe, B.V. Skryabin, S.M. Belcher, C.A. Zerillo, C. Schmauss, The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell llines, J. Biol. Chem. 270 (1995) 14168–14174.
[40] H. Hosoda, T. Miyao, S. Uchida, S. Sakai, S. Kida, Development of a tightly-regulated tetracycline-dependent transcriptional activator and repressor co-expression system for the strong induction of transgene expression, Cytotechnology 63 (2011) 211–216.
[41] C. Dong, C.M. Filipeanu, M.T. Duvernay, G. Wu, Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking, Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 853–870.
[42] K.A. Adipietro, J.D. Mainland, H. Matsunami, Functional evolution of mammalian odorant receptors, PLoS Genet. 8 (2012) e1002821.
[43] D.J. Slotboom, R.H. Duurkens, K. Olieman, G.B. Erkens, Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution, Methods 46 (2008) 73–82.
[44] A. Korepanova, E.D. Matayoshi, HPLC-SEC characterization of membrane protein-detergent complexes, Curr. Protoc. Protein Sci. 29.5 (2012) 1–12.
[45] S.G. Rasmussen, B.T. DeVree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J.M. Mathiesen, S.T. Shah, J.A. Lyons, M. Caffrey, S.H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W.I. Weis, R.K. Sunahara, B.K. Kobilka, Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex, Nature 477 (2011) 549–555.
[46] A. Matsui, Y. Go, Y. Niimura, Degeneration of olfactory receptor gene repertories in primates: no direct link to full trichromatic vision, Mol. Biol. E 27 (2010) 1192–1200.
[47] N. Kang, J. Koo, Olfactory receptors in non-chemosensory tissues, BMB Rep. 45 (2012) 612–622.
[48] C. Flegel, S. Manteniotis, S. Osthold, H. Hatt, G. Gisselmann, Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing, Plos One 8 (2013) e55368.
[49] C. Wu, Y. Jia, J.H. Lee, Y. Kim, S. Sekharan, V.S. Batista, S.J. Lee, Activation of OR1A1 suppresses PPAR-gamma expression by inducing HES-1 in cultured hepatocytes, Int. J. Biochem. Cell Biol. 64 (2015) 75–80.
[50] A. Einhauer, A. Jungbauer, The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins, J. Biochem. Biophys. Methods 49 (2001) 455–465.
[51] J.L. Baneres, A. Martin, P. Hullot, J.P. Girard, J.C. Rossi, J. Parello, Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1, J. Mol. Biol. 329 (2003) 801–814.
[52] H. Ren, D. Yu, B. Ge, B. Cook, Z. Xu, S. Zhang, High-level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1, Plos One 4 (2009) e4509.
[53] F. Wade, A. Espagne, M.A. Persuy, J. Vidic, R. Monnerie, F. Merola, E. Pajot-Augy, G. Sanz, Relationship between homo-oligomerization of a mammalian olfactory receptor and its activation state demonstrated by bioluminescence resonance energy transfer, J. Biol. Chem. 286 (2011) 15252–15259.
[54] J.F. White, J. Grodnitzky, J.M. Louis, L.B. Trinh, J. Shiloach, J. Gutierrez, J.K. Northup, R. Grisshammer, Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 12199–12204.
[55] L. Albizu, M. Cottet, M. Kralikova, S. Stoev, R. Seyer, I. Brabet, T. Roux, H. Bazin, E. Bourrier, L. Lamarque, C. Breton, M.L. Rives, A. Newman, J. Javitch, E. Trinquet, M. Manning, J.P. Pin, B. Mouillac, T. Durroux, Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues, Nat. Chem. Biol. 6 (2010) 587–594.

[56] J. Hu, K. Hu, T. Liu, M.K. Stern, R. Mistry, R.A. Challiss, S. Costanzi, J. Wess, Novel structural and functional insights into M3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation, J. Biol. Chem. 288 (2013) 34777–34790.
[57] S. Ferre, V. Casado, L.A. Devi, M. Filizola, R. Jockers, M.J. Lohse, G. Milligan, J.P. Pin, X. Guitart, G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives, Pharmacol. Rev. 66 (2014) 413–434.
[58] N.J. Smith, G. Milligan, Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes, Pharmacol. Rev. 62 (2010) 701–725.
[59] G. Milligan, The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors, Curr. Opin. Pharmacol. 10 (2010) 23–29.
[60] M.J. Lohse, Dimerization in GPCR mobility and signaling, Curr. Opin. Pharmacol. 10 (2010) 53–58.
[61] B. Szalai, L. Barkai, G. Turu, L. Szidonya, P. Varnai, L. Hunyady, Allosteric interactions within the AT(1) angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif, Biochem. Pharmacol. 84 (2012) 477–485.
[62] G. Milligan, The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization, Mol. Pharmacol. 84 (2013) 158–169.
[63] K.H. Ruan, V. Cervantes, J. Wu, Ligand-specific conformation determines agonist activation and antagonist blockade in purified human thromboxane A2 receptor, Biochemistry 48 (2009) 3157–3165.
[64] E. Maitrepierre, M. Sigoillot, L. Le Pessot, L. Briand, Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor, Protein Expr. Purif. 83 (2012) 75–83.
[65] Z. Potetinova, S. Tantry, L.S. Cohen, K.E. Caroccia, B. Arshava, J.M. Becker, F. Naider, Large multiple transmembrane domain fragments of a G protein-coupled receptor: biosynthesis, purification, and biophysical studies, Biopolymers 98 (2012) 485–500.
[66] L. Kaiser, J. Graveland-Bikker, D. Steuerwald, M. Vanberghem, K. Herlihy, S. Zhang, Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 15726–15731.
[67] K. Corin, P. Baaske, D.B. Ravel, J. Song, E. Brown, X. Wang, C.J. Wienken, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, Y. Luo, D. Braun, S. Zhang, Designer lipid-like peptides: a class of detergents for studying functional olfactory receptors using commercial cell-free systems, Plos One 6 (2011) e25067.
[68] K. Corin, H. Pick, P. Baaske, B.L. Cook, S. Duhr, C.J. Wienken, D. Braun, H. Vogel, S. Zhang, Insertion of T4-lysozyme (T4L) can be a useful tool for studying olfactory-related GPCRs, Mol. Biosyst. 8 (2012) 1750–1759.
[69] A.W. Kahsai, K. Xiao, S. Rajagopal, S. Ahn, A.K. Shukla, J. Sun, T.G. Oas, R.J. Lefkowitz, Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor, Nat. Chem. Biol. 7 (2011) 692–700.
[70] X.J. Yao, G. Velez Ruiz, M.R. Whorton, S.G. Rasmussen, B.T. DeVree, X. Deupi, R.K. Sunahara, B. Kobilka, The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 9501–9506.
[71] J. Shonberg, R.C. Kling, P. Gmeiner, S. Lober, GPCR crystal structures: medicinal chemistry in the pocket, Bioorg Med. Chem. 23 (2014) 3880–3906.
[72] D.M. Rosenbaum, C. Zhang, J.A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D.H. Arlow, S.G. Rasmussen, H.J. Choi, B.T. Devree, R.K. Sunahara, P.S. Chae, S.H. Gellman, R.O. Dror, D.E. Shaw, W.I. Weis, M. Caffrey, P. Gmeiner, B.K. Kobilka, Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex, Nature 469 (2011) 236–240.
[73] F. Xu, H. Wu, V. Katritch, G.W. Han, K.A. Jacobson, Z.G. Gao, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor, Science 332 (2011) 322–327.
[74] J.F. White, N. Noinaj, Y. Shibata, J. Love, B. Kloss, F. Xu, J. Gvozdenovic-Jeremic, P. Shah, J. Shiloach, C.G. Tate, R. Grisshammer, Structure of the agonist-bound neurotensin receptor, Nature 490 (2012) 508–513.
[75] R. Nygaard, T.M. Frimurer, B. Holst, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures, Trends Pharmacol. Sci. 30 (2009) 249–259.
[76] G. Lebon, T. Warne, P.C. Edwards, K. Bennett, C.J. Langmead, A.G. Leslie, C.G. Tate, Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation, Nature 474 (2011) 521–525.
[77] B. Trzaskowski, D. Latek, S. Yuan, U. Ghoshdastider, A. Debinski, S. Filipek, Action of molecular switches in GPCRs-theoretical and experimental studies, Curr. Med. Chem. 19 (2012) 1090–1109.
[78] M. Jamshad, J. Charlton, Y.P. Lin, S.J. Routledge, Z. Bawa, T.J. Knowles, M. Overduin, N. Dekker, T.R. Dafforn, R.M. Bill, D.R. Poyner, M. Wheatley, G-Protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent, Biosci. Rep. 35 (2015) e00188.

Liste des travaux scientifiques

Publications 2017-2019 :

- Heydel JM, Menetrier F, **Belloir C**, Canon F, Faure P, Lirussi F, Chavanne E, Saliou JM, Artur Y, Canivenc-Lavier MC, Briand L, Neiers F. Characterization of rat glutathione transferases in olfactory epithelium and mucus. PLoS One. 2019 Jul 24;14(7):e0220259. doi: 10.1371/journal.pone.0220259.
- Hurot C, Brenet S, Buhot A, Barou E, **Belloir C**, Briand L, Hou Y. Highly sensitive olfactory biosensors for the detection of volatile organic compounds by surface plasmon resonance imaging. Biosensors Bioelectronics. 2019 Jan 1;123:230-236. doi: 10.1016/j.bios.2018.08.072.
- Sigoillot M, Brockhoff A, Neiers F, Poirier N, **Belloir C**, Legrand P, Charron C, Roblin P, Meyerhof W, Briand L. The crystal structure of gurmarin, a sweet taste-suppressing protein: identification of the amino acid residues essential for inhibition.. Chemical Senses. 2018 Sep 22;43(8):635-643. doi: 10.1093/chemse/bjy054.
- Ployon S, Morzel M, **Belloir C**, Bonnotte A, Bourillot E, Briand L, Lesniewska E, Lherminier J, Aybeke E, Canon F.Mechanisms of astringency: Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs. Food Chem. 2018 Jul 1;253:79-87. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.141.
- **Belloir C**, Neiers F, Briand L. Sweeteners and sweetness enhancers. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017 Jul;20(4):279-285. doi: 10.1097/MCO.0000000000000377.
- **Belloir C**, Miller-Leseigneur ML, Neiers F, Briand L, Le Bon AM. Biophysical and functional characterization of the human olfactory receptor OR1A1 expressed in a mammalian inducible cell line. (2017) Protein Expression and Purification 129, 31-43.
- **Belloir C**, Savistchenko J, Neiers F, Taylor AJ, McGrane S, Briand L. (2017). Biophysical and functional characterization of the N-terminal domain of the cat T1R1 umami taste receptor expressed in Escherichia coli. PLoS One, 30;12(10):e0187051.

Posters 2016-2019 :

- **Belloir C**, Delompré T, Jeannin M, Neiers F, Briand L. (2019). Optimized vector for the functional expression of the human bitter taste receptor TAS2R14 in HEK293 cells. ECRO (European Chemoreception Research Organization) XXIX International Congress - TRIESTE, Italy, 11 - 14 September, 2019
- **Belloir C**, Poirier N, Moitrier L, Neiers F, Briand L. (2019). Strategy for recombinant expression of soluble functional N-terminal domain of human sweet taste receptor produced in Escherichia coli. AChemS (Association for Chemoreception Sciences) XLI International Congress – Bonita Springs, FLORIDA, United-States, 13-14 April, 2019
- **Belloir C**, Tornier L, Neiers F, Briand L. (2018). Expression and characterization of the human sweet taste receptor expressed in a mammalian inducible cell line. ECRO (European Chemoreception Research Organization) XXVIII International Congress - WÜRZBURG, Germany, 5 - 8 September, 2018
- **Belloir C**, Hlasny S, Neiers F, briand L. (2017). Expression and biophysical characterization of the human umami taste receptor subunits. ECRO (European Chemoreception Research Organization) XXVII International Congress. CAMBRIDGE, United Kingdom, 2 - 5 September, 2017.
- **Belloir C**, Hlasny S, Neiers F, briand L. (2017). Characterization of the ligands for the human umami taste receptor. Forum des Jeunes Chercheurs. DIJON, France – 15-16 Juin 2017

Récepteurs gustatifs humains : étude des relations structure-fonction

Résumé : Les détecteurs gustatifs aux saveurs sucré, umami et amer sont des récepteurs membranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont caractérisés par l'existence d'un domaine transmembranaire (DTM) hydrophobe et un mécanisme d'activation qui implique une protéine G hétérotrimérique.

L'homme possède 25 récepteurs à l'amer TAS2R. Ces récepteurs appartiennent à la classe A des RCPG. Leur l'architecture est constituée d'un DTM structuré en 7 hélices α qui forment le site orthostérique de liaison des molécules amères. Le récepteur au goût umami est un hétérodimère composé des sous-unités TAS1R1 et TAS1R3, alors que les sous-unités TAS1R2 et TAS1R3 s'assemblent pour composer le récepteur au goût sucré. Chacune de ces sous-unités appartient à la classe C des RCPG et partage une architecture commune, constituée d'un domaine N-terminal (DNT) extracellulaire de grande taille qui est relié au DTM par une région riche en cystéines (RRC). La contribution de chaque sous-unité au fonctionnement des récepteurs hétérodimériques demeure cependant largement inconnue.

A cause de leur nature amphipathique, les RCPG constituent une famille de protéines extrêmement difficiles à étudier d'un point de vue biochimique. Caractériser leurs interactions et déterminer leurs structures sont des enjeux importants et un véritable challenge pour les années à venir. Dans ce travail, nous avons développé différents systèmes d'expression afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent les interactions récepteur-ligand.

Pour l'étude du goût umami, les DNT de TAS1R1 et TAS1R3 ont été produits en bactérie *E. coli* sous forme de corps d'inclusions puis repliés *in vitro*. En combinant des approches biochimiques et des tests cellulaires d'activité fonctionnelle, nous avons montré que l'inosine-5'-monophosphate (IMP), un exhausteur du goût umami, se lie à TAS1R3-DNT et agit en synergie avec le sucralose et le néotame.

Concernant le récepteur au goût sucré, la sous-unité (taille complète) de TAS1R2 a été surexprimée dans une lignée cellulaire HEK293S inductible par la tétracycline. Un protocole de solubilisation et de purification a permis d'obtenir le récepteur TAS1R2 fonctionnel. Une analyse par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain a révélé que TAS1R2 est bien replié. La diffusion de lumière couplée à la gel filtration a montré que TAS1R2 était présent majoritairement sous forme dimérique. Les interactions avec les ligands sucrés mesurées par fluorescence intrinsèques ont révélé des affinités de l'ordre du micromolaire en accord avec les tests d'activité cellulaires et les pouvoirs sucrants des molécules.

Parallèlement, afin d'étudier les récepteurs au goût amer, nous avons conçu différents vecteurs d'expression du récepteur TAS2R14 afin d'améliorer son expression et son adressage à la membrane plasmique. Nous avons montré que l'utilisation de la séquence QBI SP163 en amont du codon initiateur de traduction, associée au peptide signal de la somatostatine 3 de rat en position N-terminale et à l'étiquette FLAG en position C-terminale, permettait d'augmenter la réponse fonctionnelle du récepteur aux ligands amers aussi bien en termes d'amplitude que de sensibilité. Cette construction plasmidique représente un outil prometteur pour aider à identifiés certains agonistes des TAS2R orphelins.

Mots clés : récepteurs du goût, RCPG recombinants, TAS1R2/TAS1R3, TAS1R1/TAS1R3, TAS2R, sucré, umami amer.

Human taste receptors: study of structure-function relationships

Abstract : Sweet, umami and bitter taste detectors are membrane receptors that belong to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs). They are characterized by the existence of a hydrophobic transmembrane domain (TMD) and an activation mechanism that involves a heterotrimeric G protein.

Human has 25 bitter taste receptors TAS2R. These receptors belong to class A GPCRs. Their architecture consists of a TMD structured in 7 □-helix which form the orthosteric binding site of bitter molecules. The umami taste receptor is a heterodimer composed of the TAS1R1 and TAS1R3 subunits, while the TAS1R2 and TAS1R3 subunits form the sweet taste receptor. Each subunits belongs to the class C GPCRs and shares a common architecture, consisting of a large extracellular N-terminal domain (NTD) connected to the TMD by a cysteine-rich region (CRR). However, the relative contribution of each subunit to the heterodimeric receptors function remains largely unknown.

Because of their amphipathic nature, GPCRs are extremely difficult to study from a biochemical point of view. Characterizing their interactions and determining their structures are important issues and a real challenge for the next years. In this work, we have developed different expression systems to understand molecular mechanisms that govern receptor-ligand interactions.

For the study of umami taste, the TAS1R1 and TAS1R3 NTDs were produced in *E. coli* bacteria as inclusion bodies and then folded *in vitro*. By combining biochemical approaches and functional cell assays, we have shown that inosine-5'-monophosphate (IMP), an umami flavor enhancer, binds to TAS1R3-NTD and acts synergistically with sucralose and neotame.

Regarding the sweet taste receptor, the subunit (full size) of TAS1R2 was overexpressed in a tetracycline inducible cell line HEK293S. Solubilization and purification protocol allows to obtain functional TAS1R2 receptor. Far-UV circular dichroism spectroscopy analysis revealed that TAS1R2 is well folded. Multiangle light scattering coupled with gel filtration showed that TAS1R2 was predominantly present in dimeric form. Interactions with sugar ligands measured by intrinsic fluorescence revealed micromolar range affinities in agreement with cellular assays and the sweetening powers of molecules.

In parallel, to study bitter receptors, we designed different TAS2R14 receptor expression vectors in order to improve receptor expression and target to the plasma membrane. We showed that use of the QBI SP163 sequence upstream of the translational initiation codon, associated with the signal peptide of the rat somatostatin 3 in the N-terminal position and the FLAG tag in the C-terminal position, increase the functional response of the receptor to bitter ligands both in terms of amplitude and sensitivity. This plasmid construct represents a promising tool to help identify some orphaned TAS2R agonists.

Keywords: taste receptors, recombinant GPCR, TAS1R2/TAS1R3, TAS1R1/TAS1R3, TAS2R, sweet taste, umami taste, bitter taste.